

Vysoká škola báňská – Technická univerzita Ostrava

Univerzitní studijní programy

Nanotechnologie

**Molekulární modelování jako nástroj pro studium systému
biodegradabilní kopolymer/doxorubicin**

*Molecular modeling as a tool for the study of biodegradable
copolymer/doxorubicin system*

Autor:

Šoustková Dominika

Vedoucí bakalářské práce:

Ing. Jonáš Tokarský, Ph.D.

Ostrava 2016

Zadání bakalářské práce

Student: **Dominika Šoustková**

Studijní program: B3942 Nanotechnologie

Studijní obor: 3942R001 Nanotechnologie

Téma: **Molekulární modelování jako nástroj pro studium systému biodegradabilní kopolymer/doxorubicin**
Molecular modeling as a tool for the study of biodegradable copolymer /doxorubicin system

Jazyk vypracování: čeština

Zásady pro vypracování:

Doxorubicin, léčivo z rodiny antracyklinů, je využíván k léčbě široké škály nádorových onemocnění.

Nepříznivé vedlejší účinky jeho čisté formy vedly k nutnosti využít vhodných nosičů, do kterých jsou molekuly doxorubicinu zachyceny. Biodegradabilní polymery, tzn. polymery schopné rozkladu na původní monomery, a jejich kopolymery se často a úspěšně používají jako nosiče léčiv.

Počítačové molekulární modelování je metoda, která umožňuje simulovat chování chemických látek a na základě molekulární struktury předvídat jejich vlastnosti. Modelovací software Materials Studio, používaný v Centru nanotechnologií na VŠB-TUO, je komplexní nástroj, schopný simulovat anorganické i organické struktury a na oddělení Bionanotechnologií je používán k simulaci nosičů léčiv.

V rámci této bakalářské práce budou připraveny modely kopolymeru polytrimethylenkarbonát/polyglykolová kyselina s různými délkami jednotlivých bloků. U takto připravených řetězců bude sledována interakce s doxorubicinem, chování systému kopolymer/doxorubicin v přítomnosti vody, tuhost kopolymerních řetězců apod. Výsledky molekulárního modelování budou porovnány s dostupnými experimentálními daty, zjištěnými z odborné literatury.

Cílem práce je podíl na vytváření metody charakterizace nosičů léčiv pomocí molekulárního modelování, které je levnou a účinnou alternativou k drahým a časově náročným laboratorním pokusům.

Postup práce:

1. Literární rešerše na dané téma a přečtení doporučené literatury.
2. Seznámení se základy práce v modelovacím prostředí Materials Studio.
3. Stavba modelů kopolymerů.
4. Simulace chování kopolymerů v přítomnosti doxorubicinu.
5. Stanovení veličin, použitých pro charakterizaci modelovaných látek.

Seznam doporučené odborné literatury:

HINCHLIFFE, Alan. Molecular Modelling for Beginners. 2. vyd. Velká Británie: John Wiley & Sons Ltd, 2008. ISBN 978-0-470-51313-2.

COMBA, Peter a HAMBLEY, Trevor W. Molecular Modeling of Inorganic Compounds, 2nd, Completely Revised and Enlarged Edition. 2. vyd. Velká Británie: John Wiley & Sons Ltd, 2008. ISBN 978-3-527-61299-4.

SANSON, Charles, Christophe SCHATZ, Jean-François LE MEINS, Alain SOUM, Julie THÉVENOT, Elisabeth GARANGER a Sébastien LECOMMANDOUX. A simple method to achieve high doxorubicin loading in biodegradable polymersomes. Journal of Controlled Release. 2010, vol. 147, iss. 3., p. 428-435. DOI: 10.1016/j.jconrel.2010.07.123. Dostupné z: <http://80.www.sciencedirect.com/dialog.cvut.cz/science/article/pii/S0168365910006504>


Odborné články o biodegradovatelných polymerech.

Formální náležitosti a rozsah bakalářské práce stanoví pokyny pro vypracování zveřejněné na webových stránkách fakulty.


Vedoucí bakalářské práce: **Ing. Jonáš Tokarský, Ph.D.**

Datum zadání: 20. 10. 2015

Datum odevzdání: 16. 05. 2016



prof. Ing. Jaromír Pištora, CSc.
vedoucí katedry



prof. Ing. Petr Noskovič, CSc.
prorektor pro studium



Místopřísežné prohlášení

Prohlašuji, že jsem bakalářskou práci vykonala samostatně pod vedením vedoucího bakalářské práce a uvedla jsem všechny použité podklady a literaturu.

V Ostravě dne 16.5.2016

.....

Šoustková Dominika

Prohlášení

- Byla jsem seznámena s tím, že na moji bakalářskou práci se plně vztahuje zákon č.121/2000 Sb. – autorský zákon, zejména §35 – užití díla v rámci občanských a náboženských obřadů, v rámci školních představení a užití díla školního a §60 – školní dílo.
- Beru na vědomí, že Vysoká škola báňská – Technická univerzita Ostrava (dále jen VŠB – TUO) má právo nevýdělečně ke své vnitřní potřebě bakalářskou práci užít (§35 odst. 3).
- Souhlasím s tím, že jeden výtisk bakalářské práce bude uložen v Ústřední knihovně VŠB - TUO k prezenčnímu nahlédnutí a jeden výtisk bude uložen u vedoucího bakalářské práce. Souhlasím s tím, že údaje o bakalářské práci budou zveřejněny v informačním systému VŠB - TUO.
- Bylo sjednáno, že s VŠB-TUO, v případě zájmu z její strany, uzavřu licenční smlouvu s oprávněním užít dílo v rozsahu §12 odst. 4 autorského zákona.
- Bylo sjednáno, že užít své dílo – bakalářskou práci nebo poskytnout licenci k jejímu využití mohu jen se souhlasem VŠB-TUO, která je oprávněna v takovém případě ode mne požadovat přiměřený příspěvek na úhradu nákladů, které byly VŠB -TUO na vytvoření díla vynaloženy (až do jejich skutečné výše).
- Beru na vědomí, že odevzdáním své práce souhlasím se zveřejněním své práce podle zákona č. 111/1998 Sb., o vysokých školách a o změně a doplnění dalších zákonů (zákon o vysokých školách), ve znění pozdějších předpisů, bez ohledu na výsledek její obhajoby.

V Ostravě dne 16.5.2016

.....

jméno a příjmení studenta

U Lesa 870/34c Karviná-Ráj 73401

adresa trvalého pobytu studenta

Poděkování

Tato bakalářská práce byla podpořena Evropským fondem regionálního rozvoje (ERDF) v rámci projektu Centra Excelence IT4Innovations (CZ.1.05/1.1.00/02.0070).

Chtěla bych poděkovat vedoucímu práce panu Ing. Jonáši Tokarskému, Ph.D. za cenné rady, odborné vedení, ochotu a hlavně trpělivost, kterou mi věnoval v průběhu celé bakalářské práce. Také bych ráda poděkovala svému konzultantovi Ing. Dominiku Hlaváčovi. Děkuji také rodině a přátelům za jejich podporu.

Abstrakt

Systém léčivo / lékový nosič ve složení doxorubicin / poly(trimethylenkarbonát)-poly(glutamová kyselina) byl studován pomocí molekulárního modelování v modelovacím prostředí Materials Studio. V této práci bylo popsáno chování klastrů léčivo/nosič v bezvodém i vodním prostředí, bylo stanoveno místo uchycení léčiva na řetězci nosiče a byl studován vliv množství molekul doxorubicinu na strukturu nosiče. V části věnované modelům klastrů léčivo/nosič ve vodném prostředí byly testovány dvě metody přípravy iniciálních modelů, z nichž však jen jedna vedla k realistickým výsledkům. V závěru práce bylo ukázáno, jak znalost struktury na molekulární úrovni může být užitečná při odhadu struktury reálných klastrů systému léčivo / lékový nosič.

Klíčová slova:

kopolymer, nosič léčiv, poly(trimethylenkarbonát)-poly(glutamová kyselina), doxorubicin, molekulární modelování

Vzor citace:

Šoustková, Dominika. *Molekulární modelování jako nástroj pro studium systému biodegradabilní kopolymer/doxorubicin*. Ostrava, 2015. Bakalářská práce. Vysoká škola báňská - Technická univerzita Ostrava. Vedoucí práce Ing. Jonáš Tokarský, Ph.D.

Abstract

Drug / drug carrier system with the composition doxorubicin / poly(trimethylene carbonate)-poly(glutamic acid) was studied using molecular modeling in the Materials Studio modeling software. Behaviour of drug / drug carrier clusters in anhydrous and aqueous environment was described, the site where the drug molecule is the most strongly anchored on carrier was determined, and influence of the number of doxorubicin molecules on structure of carrier was studied. Two methods of preparation of initial models were tested in the part focused on drug / drug carrier clusters in aqueous environment but only one of them led to realistic results. In the final part of this work it was shown how knowledge of the structure at the molecular level may be useful in estimating the structure of drug / drug carrier clusters obtained from real sample.

Keywords:

copolymer, drug carrier, poly(trimethylene carbonate)-poly(glutamic acid), doxorubicin, molecular modeling

Reference format:

Šoustková, Dominika. *Molecular modeling as a tool for the study of biodegradable copolymer / doxorubicin system*. Ostrava, 2015. Bachelor thesis. VŠB – Technical University of Ostrava. Supervisor Ing. Jonáš Tokarský, Ph.D.

Obsah

| | |
|---|----|
| Seznam použitých značek a symbolů | 11 |
| 1. Úvod | 12 |
| 2. Teoretická část | 13 |
| 2.1. Doxorubicin | 13 |
| 2.1.1. Doxorubicin a jeho charakteristika | 13 |
| 2.1.2. Historie a výzkum doxorubicinu | 14 |
| 2.2. Polymery | 15 |
| 2.2.1. Základní vlastnosti a rozdělení polymerů | 15 |
| 2.2.2. Příprava polymerů | 16 |
| 2.2.3. Biologické vlastnosti polymerů | 16 |
| 2.2.4. Kopolymery | 17 |
| 2.3. Biodegradabilní polymery | 18 |
| 2.3.1. Kyselina polyglutamová | 18 |
| 2.3.2. Polytrimethylen karbonát | 19 |
| 2.4. Molekulární modelování | 20 |
| 2.3.1. Princip silového pole | 20 |
| 2.3.2. Geometrická optimalizace | 21 |
| 2.3.3. Molekulární dynamika | 22 |
| 2.3.4. Silové pole COMPASS | 23 |
| 2.3.5. Výpočet mísitelnosti | 24 |
| 3. Praktická část | 25 |
| 3.1. Určení nejvýhodnější polohy doxorubicinu na řetězci PTMC-PGA | 25 |

| | | |
|--------|--|----|
| 3.2. | Množství doxorubicinu na řetězci PTMC-PGA a jeho vliv na strukturu | 29 |
| 3.3. | Modely podle experimentálních dat | 30 |
| 3.4. | Modely podle experimentálních dat ve vodném prostředí | 44 |
| 3.4.1. | První modelovací strategie..... | 44 |
| 3.4.2. | Druhá modelovací strategie | 48 |
| 3.5. | Pronikání vody a struktura reálných částic | 51 |
| 4. | Závěr | 55 |
| | Reference | 56 |

Seznam použitých zkratk

| | |
|------|----------------------------------|
| PGA | kyselina polyglutamová |
| PTMC | polytrimethylen karbonát |
| DLC | drug loading content |
| TEM | transmisní elektronový mikroskop |

1. Úvod

Nanotechnologie je oblast vědy a také průmyslu snažící se cíleně manipulovat s atomy či molekulami tak, aby vznikaly materiály a látky vykazující netradiční vlastnosti nebo předměty skládající se z jednotlivých atomů. Jelikož hovoříme o rozměrech od 1 do 100 nm, mají tyto látky jiné vlastnosti a chování než látky větších rozměrů [1].

V dnešní době se tento vědní obor snaží najít co největší uplatnění především v oblasti medicíny a vznikl tak nový pojem nanomedicína. Bohužel, dostupných klinických aplikací tohoto oboru je zatím velmi málo. Jedná se především o nanomedicínu v diagnostice (biočipy, které umožňují sekventovat DNA), v zobrazovacích metodách (magnetická rezonance, u které se používá jako kontrastní látka nanočástice), v chirurgických oborech a hlavně ve farmakoterapii a v onkologii. Hlavním směrem farmakoterapie je využití nanočástic pro transport léčiva, jeho nasměrování námi požadovaným směrem do centra poškození, atd, [2].

Tato bakalářská práce je zaměřena na studium kopolymerního nosiče léčiva metodou molekulárního modelování. V teoretické části práce je nejprve uvedena charakteristika molekuly léčiva doxorubicinu. Poté následuje část zabývající se polymery, jejich přípravou a vlastnostmi. Třetí tematický celek představuje biodegradabilní polymery PGA a PTMC na které se navazuje molekula doxorubicinu. Poslední část uvádí do problematiky molekulárního modelování vysvětlením základních principů geometrické optimalizace, molekulární dynamiky, silového pole COMPASS a metody výpočtu mísitelnosti.

Praktická část bakalářské práce je věnována studiu interakce molekuly doxorubicinu s kopolymerním řetězcem PTMC-PGA a struktuře klastrů doxorubicin/PTMC-PGA. Tyto interakce jsou zkoumány pomocí geometrické optimalizace a molekulární dynamiky.

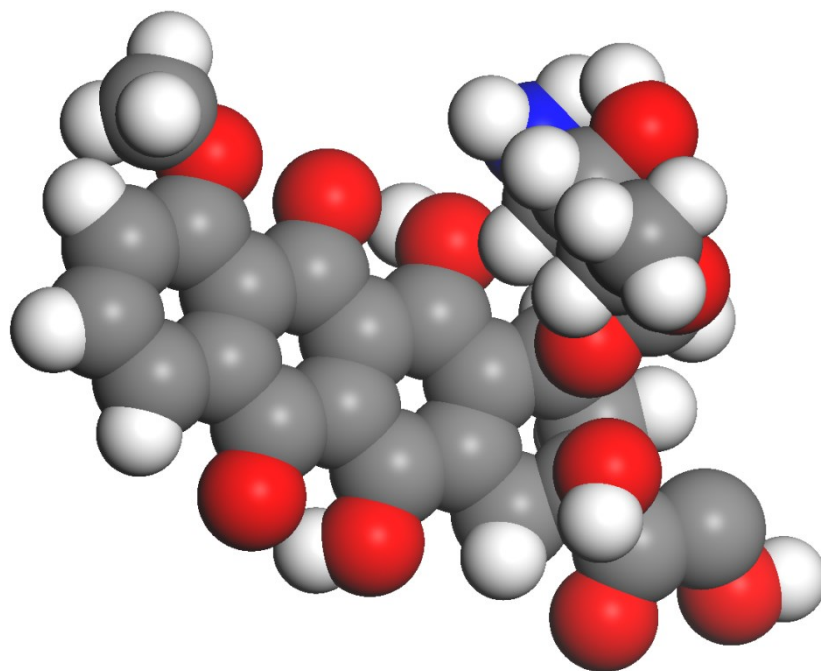
2. Teoretická část

2.1. Doxorubicin

2.1.1. Doxorubicin a jeho charakteristika

Doxorubicin (též hydroxydaunorubicin nebo hydroxydaunomycin; systematický název podle IUPAC (7S,9S)-7-[(2R,4S,5S,6S)-4-amino-5-hydroxy-6-methyloxan-2-yl]oxy-6,9,11-trihydroxy-9-(2-hydroxyacetyl)-4-methoxy-8,10-dihydro-7H-tetracen-5,12-dion; sumární vzorec $C_{27}H_{29}NO_{11}$; CAS 23214-92-8), je lék používaný k léčbě mnoha typů rakoviny, ale nejčastěji u rakoviny prsu. Struktura doxorubicinu je uvedena na Obrázku 1. Jeho klinické použití je limitováno výskytem srdeční myopatie (onemocnění srdečního svalstva) závislé na kumulativní použité dávce, která může vést k fatálnímu srdečnímu selhání. Doxorubicin byl vyvinut s předpokladem snížení kardiotoxicity (vlastnost vedoucí k poškození srdečního svalu a tím ke zhoršení srdečních funkcí) při zachované protinádorové účinnosti [3].

Jedná se o chemoterapeutické léčivo, o antibiotikum ze skupiny antracyklinů, která společně s látkami ze skupiny aktinomycinů ovlivňuje strukturu DNA. Pevně se spojuje s oběma řetězci deoxyribonukleové kyseliny (DNA), ve které je uložena genetická informace. Toto pevné spojení brání replikaci DNA před dělením buňky, ale znemožňuje i transkripci ("načítání") genetické informace [4]. Doxorubicin je podáván intravenózně, neexistuje v tuhé formě (pilulka) [3].



Obrázek 1: Struktura doxorubicinu. Atomy uhlíku jsou šedé, atomy kyslíku jsou červené, atomy vodíku jsou bílé a atom dusíku je modrý.

2.1.2. Historie a výzkum doxorubicinu

Doxorubicin byl poprvé izolován roku 1960 z houby *Streptomyces peucetius* var. *caesius* ve Farmitalia Research Laboratories of Milane. K tomuto objevu došlo záhy po objevu prvního antracyklinu, daunorubicinu, který se od doxorubicinu liší pouze hydroxylovou skupinou na methylovém konci acetylové skupiny. Oproti doxorubicinu je však daunorubicin používán pouze u akutní leukémie. Na konci šedesátých let dvacátého století byla u daunorubicinu zjištěna jeho protinádorová aktivita, a také toxicita pro nádorem nepostížené buňky. V půlce sedmdesátých let minulého století bylo v USA toto léčivo schváleno jako lék pro pacienty trpícími jakýmkoli nádorovým onemocněním. Nadále se ale vedl výzkum pro studium léčiva doxorubicinu, jelikož se vědci domnívali, že by měl mít stejné nebo lepší protinádorové účinky a také menší buněčnou toxicitu. Základní chemická struktura dnes používaných léčiv ze skupiny antracyklinů je stejná, menší odchylky jsou pouze v antracyklinovém kruhu. Za posledních bezmála čtyřicet let bylo v tomto farmakologickém odvětví testováno již více než dva tisíce produktů, ale zatím doxorubicin stále patří mezi nejpoužívanější a nejúčinnější dostupný lék. Další výzkumy s cílem snížit toxicitu léku se věnovaly možnostem např. podávání neaktivního léčiva, jež by bylo aktivováno až po dosažení cílových buněk, zapouzdření léku do

fosfolipidového transportního systému, atd. Dále byla zkoumána další léčiva, která by při podávání společně s doxorubicinem snižovaly jeho toxicitu [5].

2.2. Polymery

2.2.1. Základní vlastnosti a rozdělení polymerů

Polymery jsou chemické látky obsahující velkou škálu vlastností, jejich molekuly jsou většinou tvořeny atomy uhlíku, vodíku a kyslíku, často také dusíku, chloru i mnoho jiných prvků. Může se jednat jak o přírodní látky tak i o synteticky vyrobené, v jejich veliké molekule, čili makromolekule, se několikrát opakovaně opakuje základní monomerní jednotka. Lze si je představit jako chemickou skládku umožňující neobvyklou a mnohonásobnou variabilitu výsledných struktur i vlastností. Na nejzákladnější úrovni dělíme polymery na elastomery a plasty. Elastomery jsou vysoce elastické polymery, které lze malou silou a za běžných podmínek značně deformovat a to bez porušení, přičemž deformace je vratná. Jedná se například o kaučuky. Plasty jsou za běžných podmínek převážně tvrdé, velmi často i křehké. Dojde-li ke zvýšení teploty, stávají se plastickými a tvarovatelnými [6].

V první polovině dvacátého století byly vytvořeny syntetické polymery poskytující rozvoj výroby syntetických vláken, gumárenství, plastikářského průmyslu, průmyslu obalů a folií, průmyslu nátěrových hmot a kompozitních materiálů, které pozitivně ovlivnily vývoj technologií od letectví až po sportovní výzbroj. Tyto průmyslové oblasti a materiály jsou nedílnou součástí světového hospodářství konce dvacátého století. Představte si, že by polymery náhle vymizely ze světa, dnešní technické civilizace a ekonomika by pocítila okamžité zhroucení.

Chemie a fyzika polymerů dnes zkoumá a dále vylepšuje klasické polymery, současně však také vytváří zcela nové polymerní materiály. Je třeba zmínit tři velmi důležité oblasti: (a) polymery pro lékařské aplikace, (b) materiály pro přenos, zpracování a uchování informací a (c) inteligentní materiály. Chemie polymerů ovšem poskytuje nespočet dalších pozoruhodných témat, jako jsou selektivní membrány, nové typy katalyzátorů, anorganicko-organické polymery nebo nové kopolymery. Ty naleznou uplatnění v materiálovém inženýrství, jako kompatibilizátory (homogenizační činidla) v polymerních směsích, membrány pro separace kapalin a plynu, nebo v medicíně. Poslední vývoj ve fyzice polymerů poukazuje na možnosti takzvaných inteligentních

materiálů. Tyto zvláštní materiály by měly měnit své vlastnosti v závislosti na vnějších podmínkách, například optickou propustnost, viskozitu nebo tuhost. Tyto aktivní materiály jsou schopny do určité míry již dnes napodobit chování biologických tkání. Syntetické polymery tedy mohou nést určité informace a vykonávat specifické funkce jako přírodní makromolekuly. V tomto směru výzkum prozatím ještě nedošel k praktickým aplikacím [7].

2.2.2. Příprava polymerů

Polymerace je chemická reakce, ve které dochází ke spojení molekuly nízkomolekulární sloučeniny (monomeru) a několikanásobným opakováním tvoří konečnou makromolekulární látku, polymer. Je-li monomer schopen vytvořit chemickou vazbu, čili obsahuje-li pouze dvě místa schopná se navázat na sousední monomery, je výsledkem této reakce lineární polymer. Mohou také vznikat polymery rozvětvené nebo prostorově zesíťované, ale pouze při větším počtu funkčních míst. Zásadní vliv na chemické, fyzikální a mechanické vlastnosti polymeru má základní stavební jednotka, čili monomer [7]. V rámci této práce byl studován kopolymer složený z polytrimethylen karbonátu a z polyglutamové kyseliny (PTMC-PGA), jehož jedna část, polytrimethylen karbonát, je právě takovýmto příkladem nesouladu mezi strukturou monomeru a základní polymerní jednotky.

2.2.3. Biologické vlastnosti polymerů

Významnou oblastí, v níž se v dnešní době polymery uplatňují, je medicína. K biomedicínským účelům se nejčastěji používají polymery nedegradabilní, jako například PE (polyethylen), PP (polypropylen), PS (polystyren), PTFE (polytetrafluorethylen) a silikony, nebo také biodegradabilní polylaktáty a polyglykoly. Termín biodegradabilní znamená, že polymer je biologicky rozložitelný. Polymery jsou využívány díky své cenové dostupnosti, snadné opracovatelnosti a velmi dobrým mechanickým vlastnostem. Tyto materiály se stávají atraktivními díky značné elasticitě a nepatrné specifické hmotnosti, přičemž mezi nejdůležitější a nečastější využití patří transplantace měkkých tkání. V současnosti jsou polymery v lékařské praxi používány např. jako náhrada cév, srdečních chlopní, nebo jako kultivační nosiče (substrát) kožního krytu. Mohou být využity i při konstrukci umělých kloubů a kostí pomocí vyztužení kovových nebo

keramických vláken. Uplatnění biodegradabilních polymerů je velmi perspektivní v oblasti aplikací transportu léčiv (jako jsou například hormony, cytostatika, antibiotika, růstové faktory a další) v organismu k místu jejich přímého působení. Pro mnoho polymerních aplikací je potřeba fyzikálně či chemicky modifikovat polymerní povrch a zvýšit tím jeho biokompatibilní vlastnosti jako např. zvýšení rychlosti růstu buněk na takovém povrchu, zvýšení homogenity buněčného povlaku a adheze buněk k polymernímu povrchu [7].

2.2.4. Kopolymery

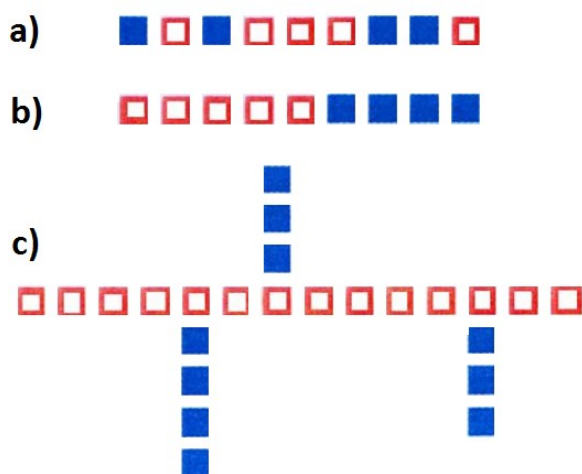
Kopolymery, tedy polymery obsahující více než jeden typ základní opakující se jednotky, obvykle mají lepší vlastnosti než fyzická směs jejich dvou mateřských homopolymerů. Kopolymerací lze získat různé struktury. Existují tři typy kopolymerů: statistické, blokové a roubované kopolymery. Přehledně jsou tyto typy znázorněny na Obrázku 2.

Statistické mají řetězce tvořeny nepravidelnými, statisticky nahodile se střídajícími mery například.

Blokové kopolymery jsou polymery, které se skládají ze dvou nebo více chemicky odlišných polymerních segmentů, mající kovalentní vazby. Řetězce jsou tvořeny dvěma nebo více bloky merů jednoho druhu [8].

Roubované mají na základním řetězci merů jednoho druhu „naroubovány“ postranní řetězce merů jiného typu.

Roubované a blokové kopolymery se od statistických kopolymerů liší vlastnostmi i při stejném chemickém složení, jelikož jednotlivé kopolymerní bloky musejí být dostatečně velké, aby výsledný blokový nebo roubovaný kopolymer neztratil všechny vlastnosti odpovídající homopolymerům [7]. Často se používají jako nosiče léčiv. Tato bakalářská práce je věnována blokovému kopolymeru složenému ze dvou základních polymerů: polyglutamovou kyselinou (PGA) a polytrimethylen karbonátem (PTMC).



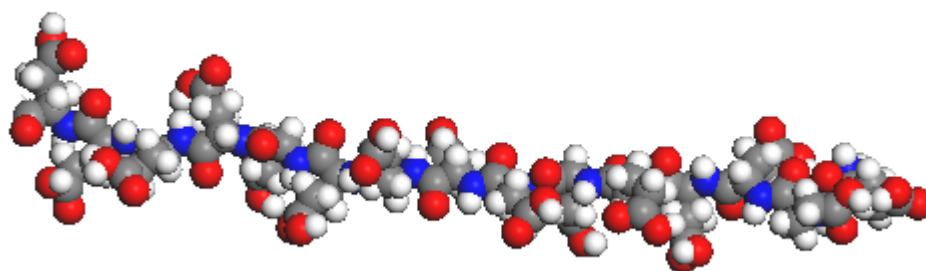
Obrázek 2: Struktura kopolymeru statistického (a), blokového (b) a roubovaného (c).

2.3. Biodegradabilní polymery

2.3.1. Kyselina polyglutamová

Kyselina polyglutamová (PGA) je přírodní polymer tvořen polymerací kyseliny glutamové, což je druh aminokyseliny. Polyaminokyseliny jsou polyamidy složené z jediné aminokyseliny. PGA byl poprvé objeven Ivánovicsem a Brucknerem ve vnější „schránkách“ mikroorganismu *Bacillus anthracis*, ze kterých byl izolován uvolněním do rozpouštěcího média v autoklávu. PGA je rovněž obsažena, ve směsi s fruktanem, v tradiční japonské potravíně zvané „*natto*“ (fermentované sójové boby).

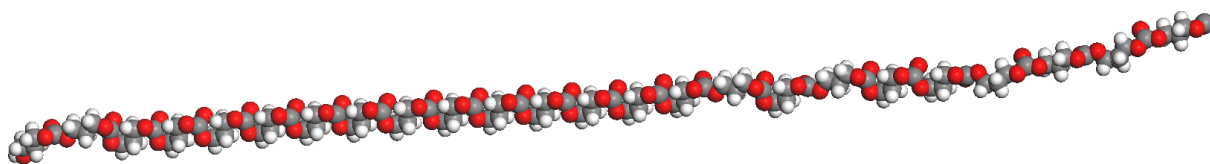
PGA je přirozeně se vyskytující aniontový polymer, který je biologicky odbouratelný, rozpustný ve vodě, jedlý a netoxický pro člověka a životní prostředí. Proto byl navržen jako dobrý kandidát pro různé průmyslové aplikace, jako třeba zahušťovadla, nosiče léčiv, tvrzené biologické lepidlo, biodegradabilní vlákna, ve vodě vysoce vstřebatelné hydrogely, biopolymerní flokulanty a absorbéry těžkých kovů. Je zřejmé, že PGA má rozmanité potenciální aplikace v potravinářství, farmaceutickém průmyslu, zdravotnictví, úpravnictví vody a dalších oborech [9]. Chemická struktura PGA je zobrazena na Obrázku 3.



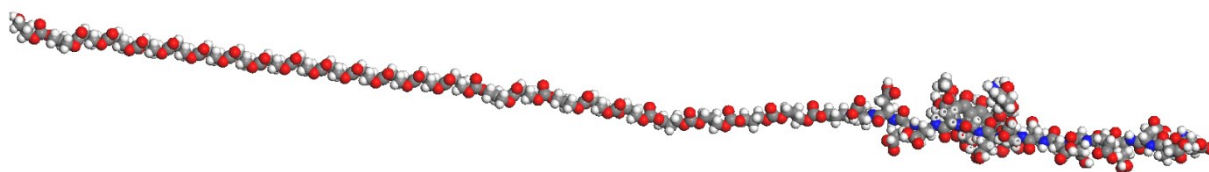
Obrázek 3: Struktura kyseliny polyglutamové. Atomy uhlíku jsou šedé, atomy kyslíku jsou červené, atomy vodíku jsou bílé a atom dusíku je modrý.

2.3.2. Polytrimethylen karbonát

Biologicky odbouratelný polyester polytrimethylen karbonát (PTMC) je atraktivním polymerem, který může být použit jako syntetický biomateriál. Vzhledem k jeho mírné biologické rozložitelnosti umožňuje při použití jakožto lékový nosič řízené uvolňování léčiva. Neprodukuje kyselé degradační produkty [10]. Chemická struktura PTMC je zobrazena na Obrázku 4.



Obrázek 4: Struktura polytrimethylen karbonátu. Atomy uhlíku jsou šedé, atomy kyslíku jsou červené a atomy vodíku jsou bílé.



Obrázek 5: Kopolymerní řetězec PTMC-PGA s doxorubicinem. Atomy uhlíku jsou šedé, atomy kyslíku jsou červené a atomy vodíku jsou bílé.

2.4. Molekulární modelování

2.4.1. Princip silového pole

Molekulární modelování je v dnešní době nepostradatelným nástrojem pro studium struktury a vlastností látek. Pojmy „teoretická chemie“, „počítačová chemie“ a „molekulární modelování“ bývají často špatně vykládány. Teoretická chemie je mnohdy vysvětlována jako soubor kvantově-chemických výpočtů. Tyto výpočty pracují s elektrony a jsou tedy schopny popsat vznik a zánik vazby v rámci chemických reakcí. Hybridizace atomu, rozložení elektronové hustoty v molekule, typ vazby a další vlastnosti z výpočtů přímo vyplývají. Souhrnně jsou tyto metody nazývány pojmem molekulární modelování [11]. Molekulární mechanika a molekulární dynamika naproti tomu pracují s tzv. silovými poli. Silové pole je soubor parametrů charakterizujících atomy a vazby v modelu. Zjednodušeně řečeno jde o tabulku, která obsahuje právě ty informace, které lze získat kvantově-chemickým výpočtem (nebo pomocí experimentu). Počet informací o velikosti, hmotnosti, náboji apod. atomu a vazebných délkách, vazebných úhlech, násobnosti vazeb atd. udává přesnost a univerzálnost daného silového pole. Některá silová pole obsahují informace např. pouze pro prvky a vazby vyskytující se v organických sloučeninách. Najdeme v nich parametry pro atomy C, H, N, S, O a halogeny, avšak žádné jiné. Jiná pole se snaží obsáhnout všechny prvky v periodické tabulce. Některá pole jsou koncipována pro výpočty jen některých typů struktur (např. jen proteiny, jen polymery či jen organokovové komplexy) jiná zvládnou popsat širší škálu různých látek, takže je lze použít pro simulaci hybridních struktur obsahujících organické i anorganické části.

Hovoříme-li v souvislosti se silovými poli o atomech, máme ve skutečnosti na mysli tzv. atomové typy. Vzhledem k tomu, že molekulární modelování pomocí silových polí nepracuje s elektrony, musí být všechny možnosti (nebo alespoň co nejvíce možností) vazby, hybridizace apod. zahrnuty v této tabulce. Silové pole tedy neobsahuje parametry pro atom uhlíku jako takový, ale parametry pro různé typy uhlíku, jako např. uhlík s trojnou vazbou, uhlík v aromatickém kruhu, uhlík v sekundárním alkoholu, apod. Čím více atomových typů je v silovém poli obsaženo, tím přesnější jsou výpočty, protože

v případě, že model obsahuje neznámý atomový typ, silové pole automaticky přiřadí typ nejpodobnější, což nemusí být vždy správně. Atomové typy lze samozřejmě přiřazovat také ručně, avšak v modelu s desítkami tisíc atomů to není příliš časově úsporné.

Informace obsažené v silovém poli mohou pocházet z kvantově-mechanických výpočtů, které jsou však prováděny na samostatných molekulách, např. na jedné molekule methanu. Vaznost atomů uhlíku a vodíku, jejich parciální náboje, vazebné délky a úhly získané tímto výpočtem jsou následně zahrnuty do silového pole, pomocí kterého lze poté simulovat libovolně veliké množství molekul methanu (zůstaneme-li u tohoto příkladu). Silová pole obsahující data získaná tímto způsobem se nazývají *ab-initio* silová pole. Jsou-li data pro silové pole získána experimentálně (např. spektroskopické analýzy), hovoříme o empirickém silovém poli. Nejčastější případ tzv. semi-empirických silových polí je pak kombinací dat získaných z části kvantově-mechanickými výpočty a z části experimentálně.

Molekulární modelování pomocí empirických silových polí tedy není schopno popsat vznik a zánik vazby, ale umožňuje naproti tomu pracovat s modely obsahujícími desítky tisíc atomů, což je počet, který lze na průměrném počítači zvládnout v řádu dní. Je-li k dispozici dostatečně velký výpočetní výkon, může být tato doba kratší nebo je možné simulovat struktury obsahující stovky tisíc atomů. Zpravidla nepracujeme se strukturami, které by samy o sobě obsahovaly takové množství atomů. Veliká množství atomů v modelu jsou nejčastěji důsledkem přítomnosti molekul tekutin ve velkém nadbytku, kdy se snažíme simulovat chování roztoků nebo fázová rozhraní.

Zjednodušení na atomovou úroveň umožňuje studovat v metodách molekulového modelování chování podstatně rozsáhlejších systémů než v kvantově-chemických modelech [11]. Vysoká přesnost a komplexnost kvantově-chemických výpočtů je vykoupena vysokou výpočetní náročností. V praxi lze takto studovat modely obsahující řádově desítky atomů. Toto číslo samozřejmě roste, je-li k dispozici dostatečně velký výpočetní výkon, např. superpočítač.

V současnosti se počítačová chemie využívá ze tří hlavních důvodů. (1) Pomáhá poskytnout informaci, která se nedá získat experimentální metodou a tím pochopit specifické chování daného systému. (2) Umožňuje vyhodnotit více alternativ (reaktanty, podmínky, reakce apod.) předtím, než se uskuteční experiment. (3) Lze ji využít ke studiu systémů za extrémních podmínek (vysoké teploty a tlaky), jichž nelze (nebo jen velice obtížně) dosáhnout v laboratoři [12].

2.4.2. Geometrická optimalizace

Geometrická optimalizace je klíčovou složkou většiny výpočetních studií v té části chemie, která se zabývá strukturou nebo reaktivitou molekul [13]. Geometrická optimalizace se provádí pomocí iteračních procesů, ve kterých se atomové souřadnice a případně parametry buněk (je-li modelování prováděno v periodickém prostředí) upravuje tak, aby celková energie struktury byla minimální. Proces optimalizace je prováděn ve stále se opakujících dvou krocích. V prvním kroku je stanovena energie struktury v závislosti na aktuálním prostorovém uspořádání atomů, v druhém kroku dochází k úpravě prostorového uspořádání atomů v modelu tak, aby měl výsledek celkovou potenciální energii nižší. Minimum může být nalezeno hned po první úpravě nebo také může vyžadovat velké množství iterací (opakování) v závislosti na počáteční struktuře modelu, na jeho velikosti, na typu optimalizačního algoritmu a na formě energetického vyjádření.

Obecně platí, že struktura optimalizovaného modelu odpovídá minimu jeho potenciální energie. Geometrická optimalizace je tedy založena na snížení velikosti sil působících každý na atom v modelu. Je schopná také určit model představující chování systému v tahu nebo stlačení. Vazebné a nevazebné síly působící na atom jsou vypočteny z vyjádření potenciální energie a závisí proto na vybraném silovém poli, jehož obecný princip byl popsán výše (viz kapitola 4.1. *Princip silového pole*). V této práci bylo použito silové pole COMPASS (viz kapitola 4.4. *Silové pole COMPASS*), implementované v modelovacím prostředí Materials Studio.

Geometrická optimalizace je často používána jako předstupeň molekulární dynamiky právě pro počáteční snížení mnohdy nereálně vysoké potenciální energie ručně připraveného modelu.

2.4.3. Molekulární dynamika

Jedná se o simulační postup, který znázorňuje, jak se budou atomy ve struktuře pod vlivem vypočtených sil pohybovat v čase. Molekulární dynamika získala popularitu v materiálových vědách a od sedmdesátých let dvacátého století i v biochemii a biofyzice. Dnes se nejčastěji využívá k zpřesnění trojrozměrné struktury proteinů a jiných makromolekul. V materiálových vědách slouží molekulární dynamika ke studiu dynamických jevů na atomární a molekulární úrovni. Jedná se o výpočetní techniku,

která reprezentuje stavy systémů, které se dají obsadit za určitých podmínek. V této práci byl pro všechny modely studované pomocí molekulární dynamiky použit soubor NPT, tedy systém pevného počtu částic (N), s konstantním tlakem (P) a konstantní teplotou (T). Ke kontrole tlaku byl použit Berendsenův barostat [14], zatímco Nosého termostat [15] sloužil ke kontrole teploty. V integračním algoritmu molekulární dynamiky je velmi důležitý časový krok. Chceme-li nejlépe využít výpočetní čas, měl by být použit velký časový krok. Nicméně, v případě, že časový krok je příliš velký, může dojít k nestabilitě a nepřesnosti výpočtu [16]. V této práci byl zvolen časový krok 1 fs.

2.4.4. Silové pole COMPASS

Silové pole COMPASS znamenalo průlom v technologii silových polí. Jde o první vysoce kvalitní *ab initio* silové ustalující parametry mnohých organických a anorganických materiálů. Přestože jde o *ab initio* silové pole, jeho vývoj zahrnoval také empirickou optimalizaci. Parciální náboje atomů byly odvozeny pomocí *ab initio* elektrostatických potenciálů a používají se ke stanovení valenčních parametrů. Následně byly tvůrci tohoto silového pole provedeny úpravy parametrů tak, aby bylo dosaženo co nejlepší shody s experimentálními daty. Pro bezchybné výpočty bylo třeba upravit několik kritických valenčních parametrů plynné fáze. Velmi důležitou změnou byla také optimalizace van der Waalsových parametrů tak, aby se přizpůsobily vlastnostem kondenzované fáze.

Silové pole COMPASS má největší uplatnění v molekulách s kovalentními vazbami včetně nejběžnějších organických látek, malých anorganických molekul a polymerů. U těchto molekulárních systémů, byl COMPASS parametrizován tak, aby dokázal předpovědět různé vlastnosti molekul samotných, ale i mnoha molekul najednou. Silové pole COMPASS je v dnešní době rozšířeno o anorganické materiály: kovy, oxidy kovů a kovové halogenidy. Kombinace parametrů pro organické a anorganické látky umožňuje COMPASS studium mezifázových a hybridních systémů [16].

Potenciální energie systému je u tohoto silového pole dána vztahem:

$$\begin{aligned}
E_{\text{total}} = & \sum_b [k_2(b - b_o)^2 + k_3(b - b_o)^3 + k_4(b - b_o)^4] + \sum_{\theta} [k_2(\theta - \theta_o)^2 + k_3(\theta - \theta_o)^3 + k_4(\theta - \theta_o)^4] + \\
& \sum_{\phi} [k_1(1 - \cos \phi) + k_2(1 - \cos 2\phi) + k_3(1 - \cos 3\phi)] + \sum_{\chi} k_2\chi^2 + \sum_{b,b'} k(b - b_o)(b' - b'_o) + \\
& \sum_{b,\theta} k(b - b_o)(\theta - \theta_o) + \sum_{b,\phi} (b - b_o)[k_1 \cos \phi + k_2 \cos 2\phi + k_3 \cos 3\phi] + \sum_{\theta,\phi} (\theta - \theta_o)[k_1 \cos \phi + \\
& k_2 \cos 2\phi + k_3 \cos 3\phi] + \sum_{b,\theta} k(\theta' - \theta'_o)(\theta - \theta_o) + \sum_{\theta,\theta,\phi} k(\theta - \theta_o)(\theta' - \theta'_o)\cos \phi + \sum_{i,j} \frac{q_i q_j}{r_{ij}} + \\
& \sum_{i,j} \epsilon_{ij} \left[2 \left(\frac{r_{ij}^o}{r_{ij}} \right)^9 - 3 \left(\frac{r_{ij}^o}{r_{ij}} \right)^6 \right]
\end{aligned}
\tag{1}$$

Který se dá rozdělit na dvě části, z nichž první obsahuje členy valenční a druhá členy nevazebné. Valenční podmínky představují vnitřní souřadnice vazby (b), úhel (θ), torzní úhel (ϕ) a mimorovinný úhel (χ). Křížová spojení (*cross-terms*) zahrnující kombinaci dvou nebo tří vnitřních souřadnic jsou důležitá pro předpovídání vibračních frekvencí a jsou spojována s konformačními změnami. Jde o tato spojení: vazba-vazba (bb), úhel-úhel ($\theta\theta$), vazba-úhel ($b\theta$), vazba-torze ($b\phi$) a úhel-úhel-torze ($\theta\theta\phi$). Část obsahující nevazebné členy zahrnuje funkce pro van der Waalovu a coulombickou podmínku elektrostatické interakce [17].

2.4.5. Výpočet mísitelnosti

Floryho-Hugginsova teorie, jak je implementována v modelovacím prostředí Materials Studio v modulu Blends, umožňuje studovat párové interakce charakterizující vzájemnou rozpustnost složek ve směsích [18]. Tato rozpustnost je vyjádřena pomocí energií míchání E_{mix} .

Použitím přesnější metody neobsahující mřížku (přítomnou v původní Floryho teorii) však vyvstává nutnost vypočítat koordinační číslo pro každou molekulu v molekulárních párech zvlášť.

E_{mix} lze vyjádřit pomocí následujícího vzorce

$$E_{\text{mix}} = \frac{1}{2} (Z_{bs}(E_{bs})_T + Z_{sb}(E_{sb})_T - Z_{bb}(E_{bb})_T - Z_{ss}(E_{ss})_T) \tag{2}$$

kde E_{bs} , E_{sb} , E_{bb} a E_{ss} jsou vazebné energie, Z_{bs} , Z_{sb} , Z_{bb} a Z_{ss} jsou koordinační čísla. Index T znamená, že vypočtená hodnota E_{mix} platí jen pro danou teplotu. Indexy b a s představují tzv. *bázi* a *screen*. Jedna ze dvou molekul v páru je při interakčním výpočtu vždy ta základní (*báze*). Tato základní molekula je pevná (tzn. nachází se stále na jednom místě, je zafixována v prostoru), zatímco druhá molekula (*screen*) se vůči bázi různě natáčí a zaujímá vůči ní všechny možné polohy. V průběhu výpočtu mísitelnosti je vytvářeno obrovské množství těchto párových konfigurací a vazebnou energii je třeba chápat jako průměr všech vazebných energií vypočtených ze všech vytvořených molekulárních konfigurací těchto dvojic.

Malá hodnota E_{mix} značí, že dané dvě sloučeniny mají při dané teplotě energeticky výhodné vzájemné interakce (tj. při dané teplotě vykazuje binární směs jednu fázi) a jsou tedy dobře mísitelné. Pokud je E_{mix} velká, molekuly *báze* dávají spíše přednost obklopování se molekulami stejného typu, než molekulami *screenu* a v tomto případě se binární směs rozdělí na dvě fáze. Takové dvě látky tedy vzájemně mísitelné nejsou nebo pouze velmi špatně.

V této práci byly párové interakce pro všechny komponenty v binárních směsích vypočteny pomocí silového pole COMPASS. Každá z vazebných energií E_{bs} , E_{sb} , E_{bb} a E_{ss} byla vypočtena z jednoho milionu náhodně generovaných párů *bází* a *screenů*. K určení koordinačních čísel Z_{bs} , Z_{sb} , Z_{bb} a Z_{ss} bylo použito deset tisíc vzájemně orientovaných *bází* a *screenů*. K postavení každé konfigurace bylo použito dvacet iteračních kroků [19].

3. Praktická část

3.1. Určení nejvýhodnější polohy doxorubicinu na řetězci PTMC-PGA

Na základě údajů o struktuře doxorubicinu, PGA a PTMC (včetně kopolymeru PTMC-PGA) byly připraveny iniciální modely. Struktury doxorubicinu, PGA a PTMC (včetně kopolymeru PTMC-PGA) jsou zobrazeny na Obrázku 5 (viz kapitola 3. *Biodegradabilní polymery* v teoretické části této práce).

V první části práce bylo cílem zjistit preferované místo řetězce PGA-PTMC, na které se doxorubicin váže nejochotněji. Pro tento experiment bylo připraveno devět modelů obsahujících vždy jeden řetězec PTMC-PGA a jednu molekulu doxorubicinu,

přičemž molekula doxorubicinu byla v prvních třech modelech umístěna poblíž středu segmentu PGA, v druhých třech modelech byla umístěna poblíž středu segmentu PTMC a v poslední trojici modelů byla molekula doxorubicinu umístěna na rozhraní segmentů PGA a PTMC. V každé trojici těchto modelů byla molekula doxorubicinu umístěna vůči řetězci různými způsoby (podélně z obou stran, šikmo). Tyto modely byly postaveny jako neperiodické struktury, modely byly geometricky optimalizovány a pro výpočet interakční energie mezi molekulou doxorubicinu a řetězcem byla použita následující rovnice

$$E_{\text{int}} = E_{\text{tot},m} - E_{\text{tot},p} - E_{\text{tot},d} \quad (3)$$

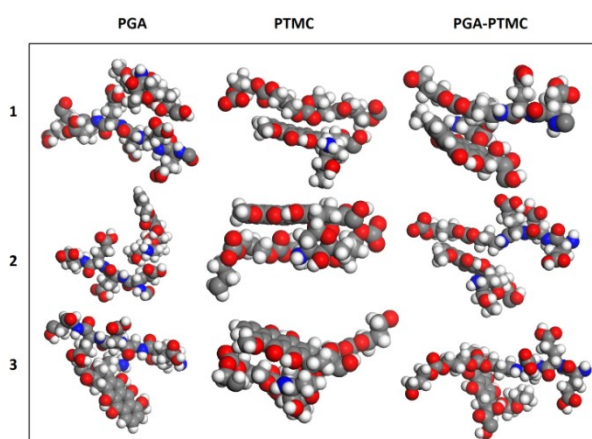
kde E_{int} je interakční energie, $E_{\text{tot},m}$ je celková potenciální energie modelu (tzn. řetězec PTMC-PGA a molekula doxorubicinu), $E_{\text{tot},p}$ je celková potenciální energie řetězce PTMC-PGA a $E_{\text{tot},d}$ je celková potenciální energie molekuly doxorubicinu.

Geometrická optimalizace probíhala za následujících podmínek. Pro parametrizaci atomů a stanovení jejich parciálních nábojů v rámci molekuly bylo použito silové pole COMPASS [17, 20]. Maximální počet iteračních kroků byl padesát miliónů a náboje jednotlivých atomů byly přiděleny silovým polem COMPASS. Konvergenční kritéria změny působící síly, změny pozic atomů a změny celkové energie byla následující: síla 0,005 kcal/mol·Å, pozice $5,0 \cdot 10^{-5}$ Å, energie $1 \cdot 10^{-4}$ kcal/mol. Pro ostatní geometrické optimalizace modelů v rámci této bakalářské práce byly použity stejné podmínky, nebude-li výslovně uvedeno jinak.

Hodnoty E_{int} jsou uvedeny v Tabulce 1. Rozdíly v síle interakce v rámci jednoho segmentu jsou zapříčiněny původní orientací v iniciálních modelech a “reálná” hodnota je průměrem těchto hodnot. V Tabulce 1 je také vidět, kde se molekula doxorubicinu nejlépe uchytila. Směrodatná odchylka je nejmenší u PTMC, jelikož se jedná o hladký řetězec, kde jsou různé polohy doxorubicinu snadno převeditelné jedna v druhou, a proto se E_{int} moc od sebe neliší. U PGA jde o strukturovanější řetězec, tudíž odchylka je o něco větší a předěl PTMC-PGA je ze všech tří možností nejcitlivější na počáteční polohu molekuly doxorubicinu, takže odchylka je zřetelně největší. Trend je nicméně zřejmý, takže nebylo třeba dělat více modelů. Z Tabulky 1 je patrné, že se molekula doxorubicinu nejsilněji uchytila na řetězci PGA v první pozici, jelikož má nejnížší energii. Tato poloha, spolu s dalšími, je vidět na Obrázku 6.

Tabulka 1: Interakční energie (kcal/mol) pro modely s různými orientacemi a pozicemi molekuly doxorubicinu na kopolymerním řetězci PTMC-PGA. V pozici PGA a PTMC byla molekula doxorubicinu umístěna uprostřed PGA a PTMC segmentu kopolymeru. Pozice PTMC-PGA značí umístění molekuly doxorubicinu na rozhraní PGA s PTMC.

| orientace Dox | 1 | 2 | 3 |
|----------------------------------|---------------|----------|----------|
| pozice Dox na řetězci | PGA | PGA | PGA |
| E_{int} (kcal/mol) | -177.89 | -175.53 | -153.86 |
| $E_{\text{int,prum}}$ (kcal/mol) | -169.09±10.81 | | |
| pozice Dox na řetězci | PTMC | PTMC | PTMC |
| E_{int} (kcal/mol) | -76.08 | -75.23 | -85.36 |
| $E_{\text{int,prum}}$ (kcal/mol) | -78.89±4.59 | | |
| pozice Dox na řetězci | PTMC-PGA | PTMC-PGA | PTMC-PGA |
| E_{int} (kcal/mol) | -108.53 | -143.68 | -139.51 |
| $E_{\text{int,prum}}$ (kcal/mol) | -130.57±15.68 | | |



Obrázek 6: Tři pozice molekul doxorubicinu na každém ze segmentů řetězce. Pořadí 1-3 je shodné s pořadím v Tabulce 1. Atomy uhlíku jsou šedé, atomy kyslíku jsou červené, atomy vodíku jsou bílé, atomy dusíku jsou modré.

Určení energeticky nejvýhodnější pozice molekuly doxorubicinu na kopolymerním řetězci bylo podpořeno také výpočtem energie mísení E_{mix} podle Floryho-Hugginsovy teorie implementované v modulu Blends (viz kapitola 4.5. *Výpočet mísitelnosti* v teoretické části této práce). Vzhledem k tomu, že součástí této práce byly rovněž modely obsahující vodu (viz kapitola 3. *První modelovací strategie* a následující kapitoly v této praktické části), byla do výpočtů mísitelnosti přidána i voda. Hodnoty E_{mix} jsou uvedeny v Tabulce 2.

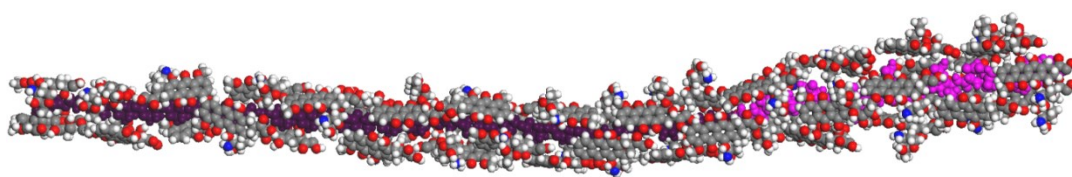
Tabulka 2: Hodnoty E_{mix} párů PGA-PTMC, PGA-Dox, PGA-H₂O, PTMC-Dox, PTMC-H₂O a Dox-H₂O vypočítané pomocí modulu Blends.

| | PGA | PTMC | Dox | H₂O |
|-----------------------|------------|-------------|------------|-----------------------|
| PGA | 0 | XXX | XXX | XXX |
| PTMC | 2,034 | 0 | XXX | XXX |
| Dox | 11,199 | 13,285 | 0 | XXX |
| H₂O | 3,03 | 1,426 | 28,501 | 0 |

Jak bylo zmíněno v kapitole 4.5. *Výpočet mísitelnosti* v teoretické části této práce, mísitelnost dvou složek je tím lepší, čím nižší je hodnota E_{mix} . Nulové hodnoty na hlavní diagonále v Tabulce 2 ukazují nekonečnou mísitelnost jednotlivých složek v sobě samých. Dále lze dvojice složek seřadit vzestupně podle E_{mix} následujícím způsobem: PTMC-H₂O, PTMC-PGA, PGA-H₂O, PGA-Dox, PTMC-Dox a Dox-H₂O. Je vidět, že tato posloupnost velice dobře souhlasí s výsledky z výpočtů hodnot E_{int} , jelikož i zde se ukázalo, že molekula doxorubicinu se lépe mísí (a tedy interaguje silněji) s PGA než s PTMC. Voda se naproti tomu lépe mísí s PTMC než s PGA. Hydrofobní charakter doxorubicinu je potvrzen velmi vysokou hodnotou E_{mix} pro pár Dox-H₂O.

3.2. Množství doxorubicinu na řetězci PTMC-PGA a jeho vliv na strukturu

Následně bylo zjišťováno potenciálně nejvyšší množství molekul doxorubicinu na kopolymerním řetězci PTMC-PGA. Pro tento účel se molekuly doxorubicinu přikládaly k řetězci tak, aby jimi byl pokryt co nejúplněji po celé své délce. Bylo zjištěno, že maximální množství molekul doxorubicinu, které mohou pokrýt celý řetězec kopolymeru PTMC-PGA, je čtyřicet tři. Tato hypoteticky nejvyšší hodnota je 507 hm. % (viz Tabulka 3). Iniciální model takto zcela zaplněného řetězce je vidět na Obrázku 7.

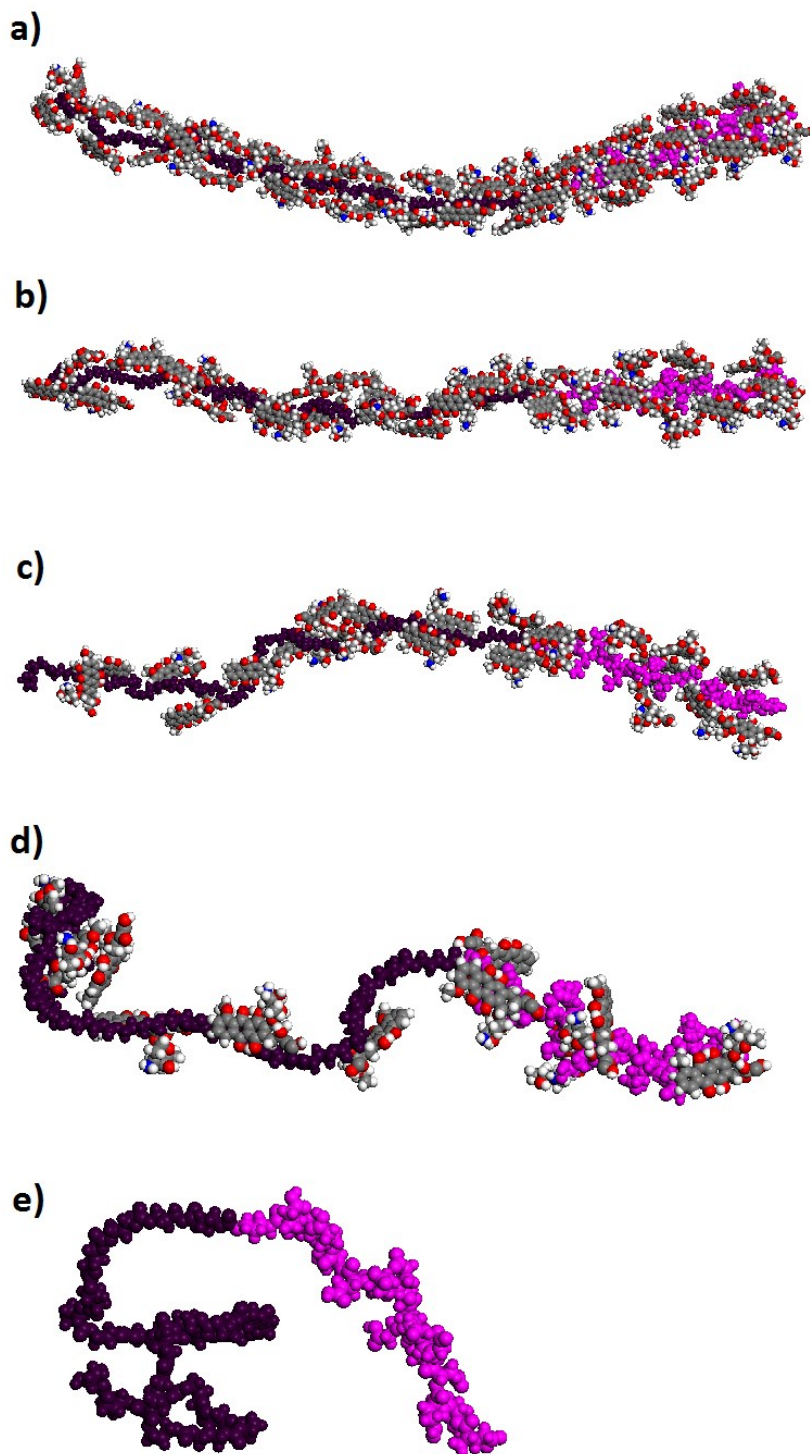


Obrázek 7: Řetězec PTMC-PGA zcela pokrytý maximálním možným množstvím molekul doxorubicinu (čtyřicet tři). Pro větší přehlednost je segment PTMC obarven tmavě fialovou barvou a segment PGA je růžový. Molekuly doxorubicinu jsou zobrazeny se standardními barvami atomů. Atomy uhlíku jsou šedé, atomy kyslíku jsou červené, atomy vodíku jsou bílé, atomy dusíku jsou modré.

Lze předpokládat, že molekuly doxorubicinu interagující s řetězcem brání jeho sbalení, tedy že délka řetězce za daných podmínek je závislá na počtu molekul doxorubicinu, které jsou na něm uchyceny. Byla proto vytvořena sada čtyř modelů s rozdílným počtem molekul doxorubicinu, které byly naskládány po celé délce řetězce PTMC-PGA. První model obsahoval maximální počet molekul doxorubicinu, tedy čtyřicet tři (tento model je vidět na Obrázku 7), druhý model obsahoval tři čtvrtiny tohoto množství (třicet tři molekuly doxorubicinu), třetí model polovinu (dvacet dva molekuly doxorubicinu) a čtvrtý model obsahoval pouze čtvrtinu maximálního množství (jedenáct molekul doxorubicinu). Při poměru délky PTMC (~ 9 nm, tedy ~ 68 % celkové délky řetězce kopolymeru) a PGA (~ 4,3 nm, tedy ~ 32 % celkové délky řetězce kopolymeru) připadá při maximálním pokrytí na část PTMC dvacet šest molekul doxorubicinu a na část PGA sedmnáct molekul doxorubicinu. Počty molekul doxorubicinu na segmentech neodpovídají procentuálně přesně poměrům délek, protože

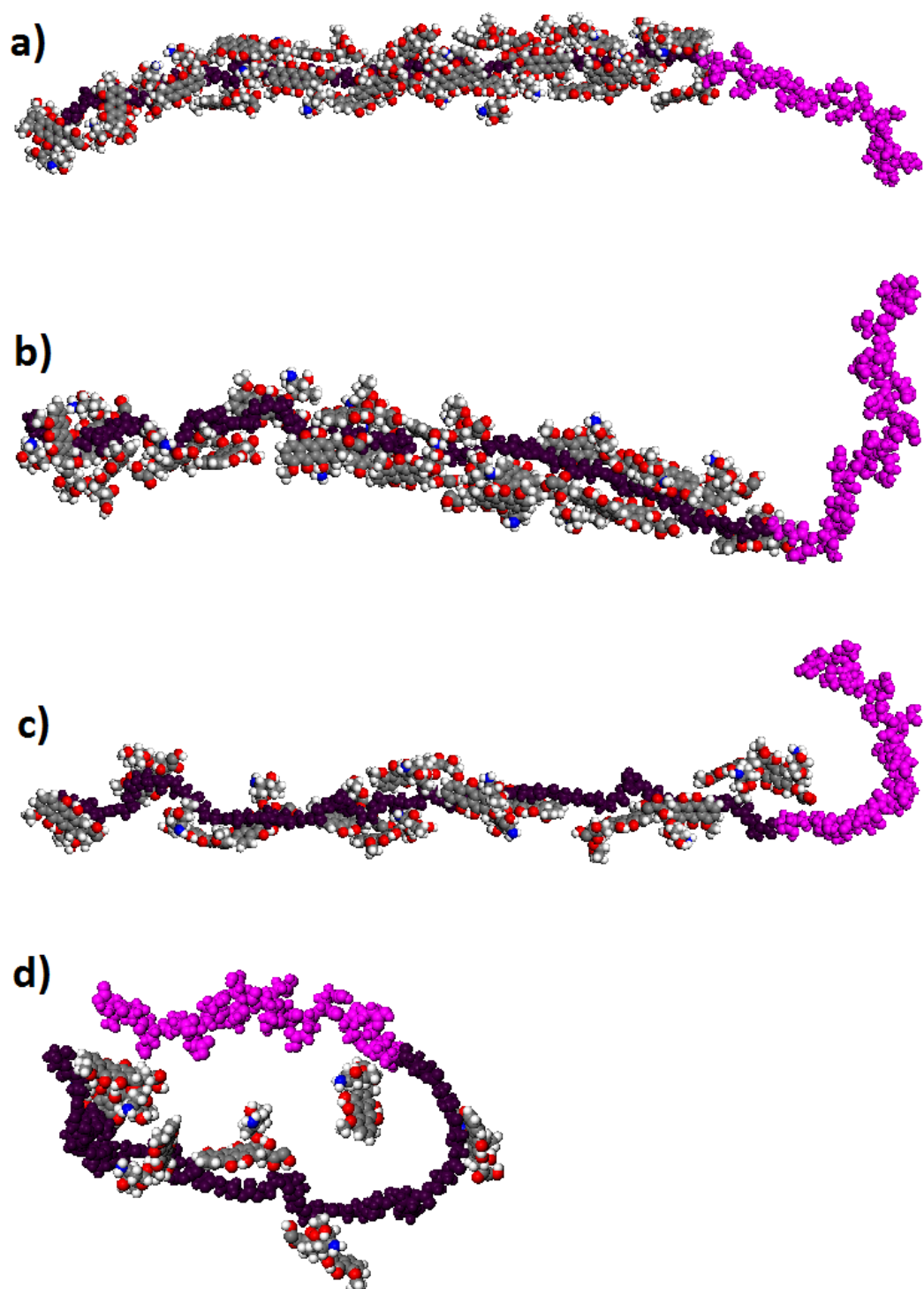
segmenty mají jiný průměr. Poté byly vytvořeny další dvě sady modelů, v nichž byla pokryta buď pouze část PTMC nebo část PGA. V druhé sadě modelů bylo na segment PTMC vloženo dvacet šest, devatenáct, třináct a sedm molekul doxorubicinu. Segment PGA zůstal nepokrytý. V třetí sadě byly ekvivalentně vytvořeny modely se sedmnácti, dvanácti, osmi a čtyřmi molekulami doxorubicinu na segmentu PGA, přičemž segment PTMC zůstal nepokrytý. Všechny těchto dvanáct modelů bylo podrobena geometrické optimalizaci, následně byla spuštěna molekulární dynamika. Podmínky molekulární dynamiky byly následující: počet kroků dynamiky bylo nastaveno na jeden milion, délka jednoho kroku se rovnala 1 fs, počet vygenerovaných framů byl dvě stě a teplota byla nastavena na 298 K.

Optimalizované modely kopolymeru PTMC-PGA pokrytého různým množstvím molekul doxorubicinu jsou ukázány na Obrázku 8. Z modelů je patrné, že přítomnost molekul doxorubicinu udržuje strukturu kopolymerního řetězce lineární tím více, čím více molekul je na něm navázáno. Molekuly doxorubicinu přiléhají k řetězci přednostně takovým způsobem, jakým je ukázán na Obrázku 6 - PGA 1, jelikož má nejnižší energii (viz Tabulka 1), proto je tato pozice vůči řetězci nejčastější i v těchto modelech. V modelu s řetězcem obsahujícím čtyřicet tři molekul doxorubicinu (model PTMC-PGA-43, Obrázek 8a) zaujímá tuto pozici ~ 65 % doxorubicinů, v modelu s řetězcem s třiceti třemi doxorubiciny (model PTMC-PGA-33, Obrázek 8b) je tato pozice patrná u ~ 64 % doxorubicinů, u modelu s řetězcem pokrytém dvaceti dvěma molekulami doxorubicinu (model PTMC-PGA-22, Obrázek 8c) je v této nejvýhodnější pozici ~ 59 % procent a v posledním modelu s řetězcem a jedenácti molekulami doxorubicinu (model PTMC-PGA-11, Obrázek 8d) je ~ 54 % molekul natočeno do ideální pozice. Lze tedy říci, že průměrně se v této pozici ve všech modelech nachází ~ 60 % molekul doxorubicinu.



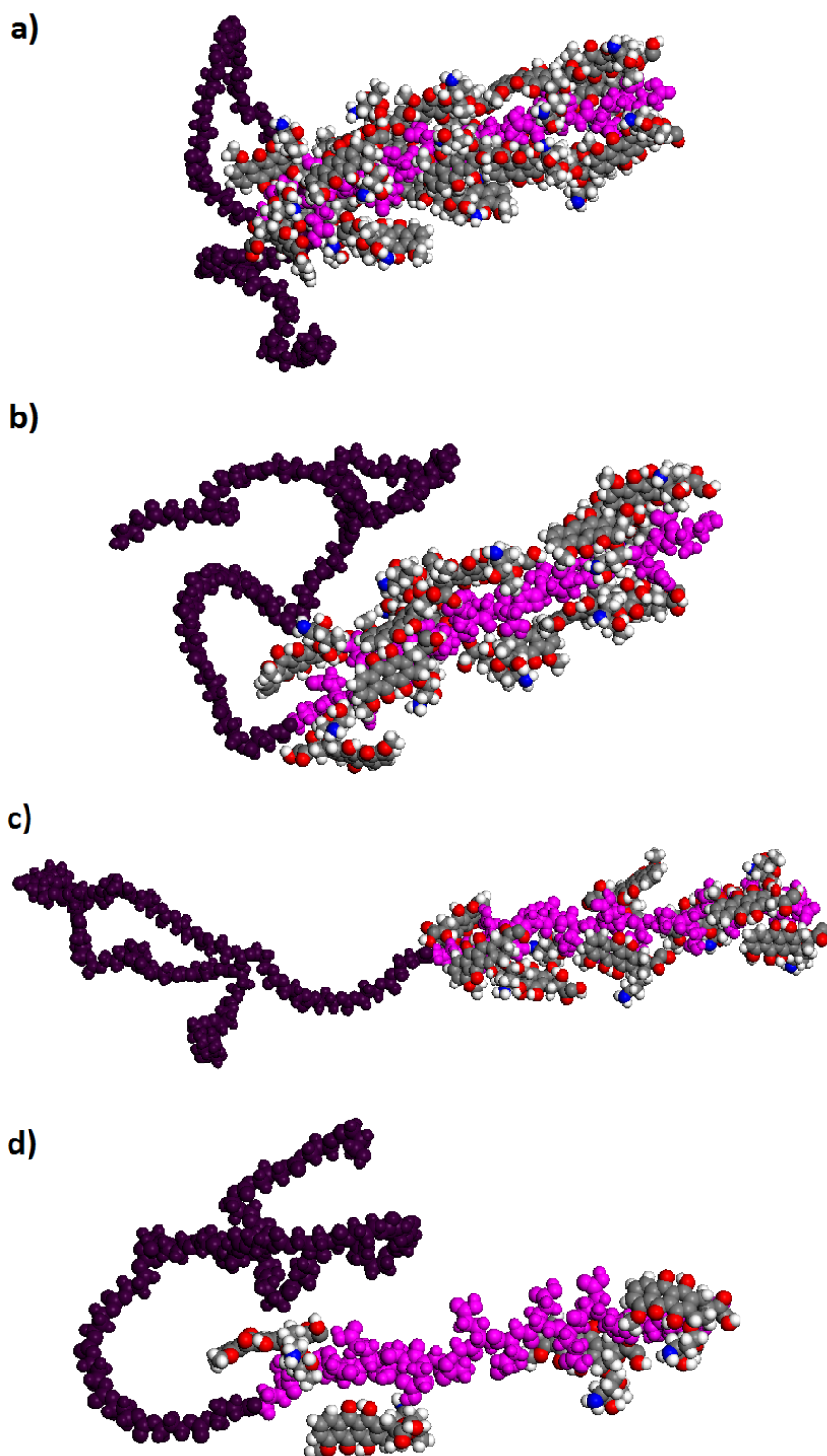
Obrázek 8: Řetězec PTMC-PGA obsahující rozdílné množství molekul doxorubicinu- a) čtyřicet tři, b) třicet tři, c) dvacet dva, d) jedenáct a e) bez doxorubicinu. Pro větší přehlednost je segment PTMC obarven tmavě fialovou barvou a segment PGA je růžový. Molekuly doxorubicinu jsou zobrazeny se standardními barvami atomů. Atomy uhlíku jsou šedé, atomy kyslíku jsou červené, atomy vodíku jsou bílé, atomy dusíku jsou modré.

Optimalizované modely se segmentem PTMC pokrytým různým množstvím molekul doxorubicinu jsou ukázány na Obrázku 9. Z modelů je patrné, že přítomnost molekul doxorubicinu udržuje strukturu kopolymerního řetězce lineární tím více, čím více molekul je na něm navázáno. Molekuly doxorubicinu přiléhají k řetězci přednostně jako na Obrázku 6- PGA 1, jelikož má nejnižší energii (viz Tabulka 1), proto je tato pozice vůči řetězci nejčastější i v těchto modelech. V prvním modelu obsahujícím řetězec a dvacet šest molekul doxorubicinu (model PTMC-26, Obrázek 9a) se v této pozici nachází ~ 65 % molekul, v druhém modelu s devatenácti doxorubiciny (model PTMC-19, Obrázek 9b) je tato pozice patrná v ~ 68 % případů, u modelu pokrytém třinácti molekulami doxorubicinu (model PTMC-13, Obrázek 9c) zahrnuje nejvýhodnější pozice ~ 77 % a v posledním modelu se sedmi molekulami doxorubicinu (model PTMC-7, Obrázek 9d) je ~ 71 % molekul natočeno v ideální pozici. Tato energeticky nejvýhodnější pozice se tedy průměrně objevuje u 70 % molekul doxorubicinu, častěji v modelech s nižším počtem doxorubicinů, což je zapříčiněno větším prostorem, který mají k dispozici, což molekulám umožňuje snáze se natočit výhodněji. Řetězec PTMC je velmi flexibilní a pokud není pokrytý molekulami doxorubicinu, má tendenci se silně kroutit a celkově tak zkracovat délku celého kopolymeru. Flexibilita řetězce vyplývá z jeho struktury (viz Obrázek 3 v teoretické části).



Obrázek 9: Molekuly doxorubicinu pokrývající segment PTMC s počtem molekul a) dvacet šest, b) devatenáct, c) třináct, d) sedm. Pro větší přehlednost je segment PTMC obarven tmavě fialovou barvou a segment PGA je růžový. Molekuly doxorubicinu jsou zobrazeny se standardními barvami atomů. Atomy uhlíku jsou šedé, atomy kyslíku jsou červené, atomy vodíku jsou bílé, atomy dusíku jsou modré.

Optimalizované modely se segmentem PGA pokrytým různým množstvím molekul doxorubicinu jsou ukázány na Obrázku 10. Z modelů je patrné, jako již na předchozích Obrázcích 8 a 9, že přítomnost molekul doxorubicinu udržuje strukturu kopolymerního řetězce lineární tím více, čím více molekul je na něm navázáno. Molekuly doxorubicinu přiléhají k řetězci přednostně jako na Obrázku 6 - PGA 1, jelikož má nejnižší energii (viz Tabulka 1), proto je tato pozice vůči řetězci nejčastější i v těchto modelech. V prvním modelu obsahujícím sedmnáct molekul doxorubicinu (model PGA-17, Obrázek 10a) zahrnuje tato pozice ~ 65%, v druhém modelu s dvanácti doxorubiciny (model PGA-12, Obrázek 10b) je tato pozice patrná v ~ 83%, v modelu s řetězcem pokrytým osmi molekulami doxorubicinu (model PGA-8, Obrázek 10c) zahrnuje nejvýhodnější pozice ~ 88% a v posledním modelu se čtyřmi molekulami doxorubicinu (model PGA-4, Obrázek 10d) je ~ 75% molekul natočeno v ideální pozici. Tato pozice se tedy u molekul doxorubicinu na PGA segmentu objevuje v 76 % případů a objevuje se častěji v modelech s nižším počtem doxorubicinů. Co se nepokrytého segmentu PGA týče, je vidět, že je poměrně rigidní a nepřítomnost molekul nijak výrazně neovlivňuje jeho tvar. Rigidita řetězce vyplývá z jeho struktury (viz Obrázek 4 v teoretické části).



Obrázek 10: Segment PGA je pokryt molekulami doxorubicinu a) sedmnáct, b) dvanáct, c) osm, d) čtyři. Pro větší přehlednost je segment PTMC obarven tmavě fialovou barvou a segment PGA je růžový. Molekuly doxorubicinu jsou zobrazeny se standardními barvami atomů. Atomy uhlíku jsou šedé, atomy kyslíku jsou červené, atomy vodíku jsou bílé, atomy dusíku jsou modré.

Tendence segmentů PGA a PTMC, stejně tak jako celého kopolymerního řetězce, ke zkroucení v závislosti na počtu molekul doxorubicinu byly diskutovány u Obrázků 8, 9 a 10. Míra tohoto zkroucení řetězce v závislosti na počtu molekul doxorubicinu byla pro celý řetězec i pro jednotlivé segmenty kvantifikována pomocí výpočtu gyračního poloměru (R_g).

Gyrační poloměr (R_g) je parametr charakterizující, pro libovolný tvar částice, její velikost. Je definován rovnicí skládající se z hmotných elementů

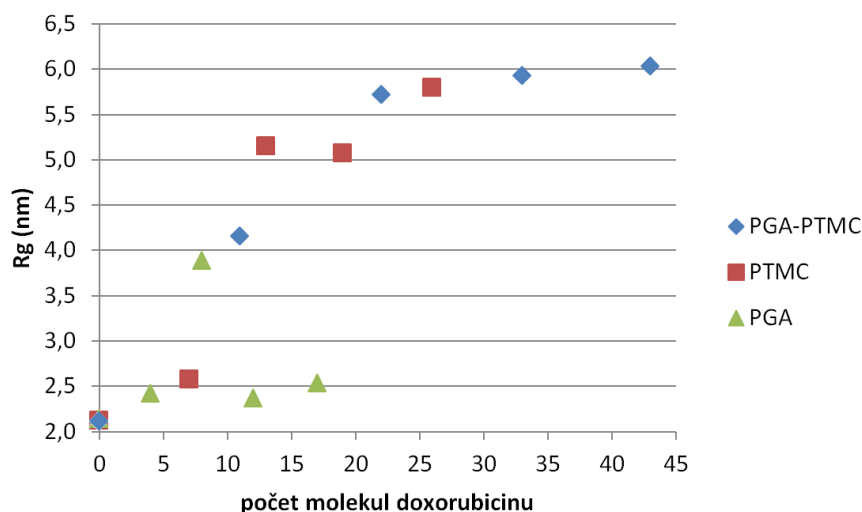
$$Rg^2 = \frac{1}{m} * \sum_{i=1}^n m_i * r_i^2 \quad (4)$$

kde m_i je hmotnost i -tého bodu, r_i je jeho vzdálenost od těžiště částice, m je celková hmotnost částice. Součet je vykonán pro všechny hmotné body a mají-li všechny konstantní hmotnost, lze tuto rovnici zjednodušit do tvaru

$$Rg^2 = \frac{1}{n} * \sum_{i=1}^n r_i^2 \quad (5)$$

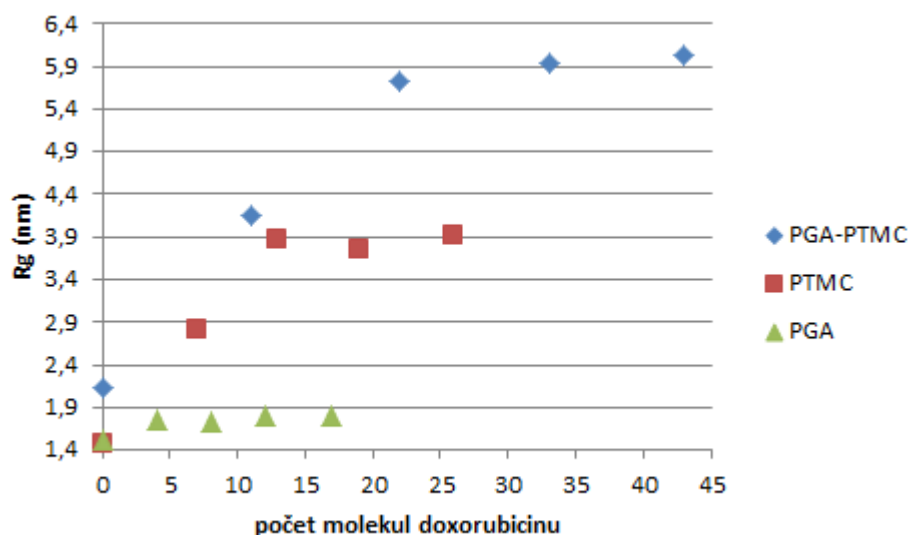
kde n je počet hmotných bodů. Parametr R_g tedy lze definovat jako kvadratický průměr vzdálenosti všech hmotných bodů od těžiště [21].

Hodnota R_g byla počítána jako průměrná hodnota z většího počtu framů trajektorie molekulární dynamiky. Framy byly vybírány pouze z té části trajektorie, ve které se celková energie modelu již příliš neměnila, a její průběh byl víceméně lineární. Ta část trajektorie molekulární dynamiky, ve které docházelo k poklesu celkové energie, nebyla do výpočtu R_g zahrnuta. Více informací o výpočtech parametrů z molekulární dynamiky lze nalézt v kapitole 2.4.3. *Molekulární dynamika* v teoretické části této práce. Hodnoty R_g se z modelů (viz Obrázky 8, 9 a 10) počítaly tak, že z kopolymerního řetězce byly odstraněny molekuly doxorubicinu a teprve poté byla vypočtena hodnota R_g . Hodnoty R_g jsou uvedeny v grafu na Obrázku 11.



Obrázek 11: Tento graf znázorňuje gyrační poloměr celého kopolymerního řetězce v závislosti na počtu molekul doxorubicinu. Řada PTMC-PGA odpovídá modelům s řetězcem pokrytým doxorubiciny na obou segmentech, řady PGA a PTMC odpovídají modelům, v nichž byly pokryty doxorubicinem pouze segmenty PGA či PTMC.

Nepokryté segmenty mají nižší R_g , jelikož jejich zkroucení nic nebrání, a tedy zkreslovaly celkovou hodnotu R_g řetězce. Proto pro přesnější výsledky se dále počítaly hodnoty R_g pouze z pokrytých segmentů, čili buď na PGA nebo na PTMC. Nepokryté segmenty v takovém modelu byly smazány, ze zbylého pokrytého segmentu byly odstraněny molekuly doxorubicinu a vypočetly se hodnoty R_g . Výsledky jsou na Obrázku 12. V případě modelů obsahujících pokrytý celý kopolymerní řetězec je situace stejná jako v předchozím případě, proto řady PTMC-PGA jsou na obou grafech (Obrázky 11 a 12) stejné. Naproti tomu, segmenty bez molekul doxorubicinu (první body dané řady) jsou různě dlouhé a proto v grafu na Obrázku 12 není shodný první bod pro všechny tři řady, jako tomu bylo v grafu na Obrázku 11.



Obrázek 12: Graf znázorňující gyrační poloměr řetězce či jeho segmentů v závislosti na počtu molekul doxorubicinu. U hodnot PGA a PTMC se gyrační poloměr počítal pouze na pokryté části řetězce, tzn. buď PGA nebo PTMC, přičemž druhý, nepokrytý segment byl smazán.

Z molekulární dynamiky byly vypočteny energie E_{int} podobným způsobem jako v kapitole 3.1. *Určení nejvýhodnější polohy doxorubicinu na řetězci PTMC-PGA*. Postup výpočtu byl následující. Z každého vygenerovaného framu dynamické trajektorie byla vypočítána nejprve celková energie E_1 celého modelu, tzn. všechny molekuly doxorubicinu a polymerní řetězec. Dále byla vypočtena celková energie E_2 všech molekul doxorubicinu (bez kopolymerního řetězce) a celková energie E_3 pouze kopolymerního řetězce (bez molekul doxorubicinu). Energie se od sebe odečetly stejně jako v případě rovnice (1) a výsledná energie E_{int} pro daný krok dynamiky byla vztažena na jednu molekulu doxorubicinu vydělením celkovým počtem molekul doxorubicinu v modelu (n).

$$E_{int} = \frac{E_1 - E_2 - E_3}{n} \quad (6)$$

Tímto způsobem bylo vypočteno tolik hodnot E_{int} , kolik bylo vygenerováno framů dynamické trajektorie. Průměrná hodnota E_{int} pak byla použita pro porovnání jednotlivých modelů.

Tabulka 3: Průměrné interakční energie E_{int} vztažené na jednu molekulu doxorubicinu a její maximální ($E_{int,max}$) a minimální ($E_{int,min}$) hodnoty. Hodnota w_1 je hmotnostní zlomek molekul doxorubicinu v systému doxorubicin/kopolymer. Hodnota w_2 (odpovídající hodnotě DLC popisované v článku [22]) je podíl hmotností molekul doxorubicinu a hmotnosti polymerního řetězce.

| MODEL | E_{int} (kcal/mol) | $E_{int,max}$ (kcal/mol) | $E_{int,min}$ (kcal/mol) | w_1 (hm.%) | w_2 (hm.%) |
|--------------------|---|---|---|--|--|
| PGA-PTMC-43 | -64,09±1,04 | -61,60 | -66,80 | 83,53 | 507,21 |
| PGA-PTMC-33 | -76,76±0,67 | -74,91 | -78,44 | 79,56 | 389,25 |
| PGA-PTMC-22 | -94,80±1,19 | -90,87 | -97,51 | 72,18 | 259,50 |
| PGA-PTMC-11 | -114,97±1,54 | -110,01 | -118,58 | 56,47 | 129,75 |
| PTMC-26 | -50,41±1,2 | -44,53 | -52,34 | 75,41 | 306,68 |
| PTMC-19 | -54,96±0,98 | -52,48 | -57,09 | 69,15 | 224,11 |
| PTMC-13 | -76,21±3,52 | -68,31 | -81,57 | 60,53 | 153,34 |
| PTMC-7 | -136,43±14,69 | -106,62 | -155,97 | 45,23 | 82,57 |
| PGA-17 | -111,46±1,38 | -107,57 | -114,33 | 66,72 | 200,52 |
| PGA-12 | -129,14±1,44 | -123,44 | -131,67 | 58,60 | 141,55 |
| PGA-8 | -116,65±3,74 | -94,40 | -124,19 | 48,55 | 94,36 |
| PGA-4 | -159,70±11,83 | -117,78 | -176,26 | 32,06 | 47,18 |

Z Tabulky 3 vyplývá, že E_{int} má vždy nejnížší hodnotu u modelů s nejmenším počtem molekul doxorubicinu, jelikož tyto molekuly mají lepší možnost se lépe zorientovat vůči segmentům PGA a PTMC tak, aby výsledná E_{int} byla co nejnížší. Lze tedy říct, že nejnížší a tedy nejsilnější hodnoty E_{int} vykazovaly molekuly doxorubicinu na segmentu PGA. Čím jsou maximální hodnoty E_{int} vyšší, s tím větší jistotou lze říct, že se daná molekula u segmentů PGA a PTMC „neuchytila“, tedy že její pozice není pro dané segmenty výhodná. Nejhuře na tom byl segment PTMC, který měl viditelně

nejvyšší hodnoty E_{int} i $E_{int,max}$. Všechny molekuly, jejichž E_{int} je pro daný model zároveň $E_{int,min}$, byly vůči řetězci natočeny stejným způsobem, jako na Obrázku 1 - PGA 1.

3.3. Modely podle experimentálních dat

Další výpočty zahrnující modely s podílem hmotností molekul doxorubicinu a hmotnosti polymerního řetězce w_2 (viz Tabulka 3) by byly vzhledem k velkému množství molekul doxorubicinu nesmírně časově náročné. Navíc tyto modely sloužily pro zjištění maximálního možného počtu doxorubicinů a jejich chování na řetězci. Experimentátoři Sanson a kol. však ve svém článku [22] uvádějí skutečné hodnoty DLC (tzn. w_2), které jsou 5 hm.%, 10 hm.%, a 23 hm.%. Tyto hodnoty nám v porovnání s modely v předchozí kapitole umožňují vytvořit si představu o skutečné situaci v systému polymer/doxorubicin. Polymer je ve skutečnosti „prázdný“, maximální reálný počet molekul doxorubicinu je pouze dvě molekuly na jeden řetězec (23 hm.%). V případě 5 a 10 hm.% je poměr molekul doxorubicinu a řetězců kopolymeru 1:2 a 1:1. Další část této práce byla věnována modelům reflektujícím tyto poměry složek.

V další části této práce tedy bylo vytvořeno šest kombinací PGA-PTMC s molekulami doxorubicinu v periodickém prostředí. Velikost periodické cely byla $150 \times 150 \times 150$ nm. Tyto kombinace byly namodelovány tak, aby tvořily vždy určitý poměr kopolymeru PGA-PTMC s molekulami doxorubicinu, uvedený v článku Sansona a kol. [22]. První model obsahoval jeden kopolymer a jednu molekulu doxorubicinu, což odpovídá hodnotě $w_2 = 10$ hm.% doxorubicinu (viz hodnota DLC v [22]). Molekula doxorubicinu byla položena na předěl mezi PGA a PTMC a model byl označen p_1d_1 . Písmena p a d v tomto značení modelů představují „polymer“ a „doxorubicin“, čísla v dolních indexech značí počet polymerních řetězců a doxorubicinů. Dále byly vytvořeny dva modely se stejným poměrem kopolymerních řetězců a doxorubicinů, ale jiným uspořádáním, tedy jeden kopolymer a dvě molekuly doxorubicinu ($w_2 = 23$ hm.%, viz hodnota DLC v [22]) umístěné opět na předělu mezi segmenty PGA a PTMC. Modely byly označeny $a.p_1d_2$ a $b.p_1d_2$. Model $a.p_1d_2$ se od modelu $b.p_1d_2$ lišil pouze tím, že molekuly doxorubicinu byly rozdílně natočeny. Poslední sada modelů obsahovala dva kopolymery s jednou molekulou doxorubicinu ($w_2 = 5$ hm.%, viz hodnota DLC v [21]). Model $a.p_2d_1$ byl tvořen dvěma rovnoběžnými kopolymery s molekulou doxorubicinu u místa předělu. Model $b.p_2d_1$ byl skoro stejný, až na to, že rovnoběžné kopolymery byly vůči sobě orientovány obráceně. Poslední model $c.p_2d_1$ byl postaven tak, že kopolymery

byly zkřížené a molekula doxorubicinu byla položena u jednoho řetězce na předělu. Z těchto modelů, odpovídajících svým složením reálným vzorkům v práci Sansona a kol. [22], jsme vycházeli po zbytek celé praktické části.

Všechny modely byly optimalizovány stejně jako v kapitole 2. *Množství doxorubicinu na řetězci PTMC-PGA a jeho vliv na strukturu*, následně byla spuštěna molekulární dynamika. Z framů dynamické trajektorie byly vypočítány hodnoty E_{int} stejným způsobem jako v kapitole 2. *Množství doxorubicinu na řetězci PTMC-PGA a jeho vliv na strukturu*, ale s tím rozdílem, že byla počítána zvlášť pro první doxorubicin a zvlášť pro doxorubicin druhý. Výsledky jsou zachyceny v Tabulce 3. Optimalizované modely jsou ukázány na Obrázku 13.

Tabulka 4: Interakční energie prvního a druhého doxorubicinu ve všech modelech.

| MODEL | E_{int} 1. dox (kcal/mol) | E_{int} 2. dox (kcal/mol) |
|-------------------------------------|---|---|
| p₁d₁ | -44,89 ± 3,73 | – |
| a.p₂d₁ | -67,33 ± 4,11 | – |
| b.p₂d₁ | -38,99 ± 4,07 | – |
| c.p₂d₁ | -64,79 ± 4,63 | – |
| a.p₁d₂ | -58,64 ± 5,20 | -56,85 ± 7,16 |
| b.p₁d₂ | -92,35 ± 1,06 | -88,77 ± 3,03 |

Vzhledem k tomu, že modely *a.p₂d₁*, *b.p₂d₁* a *c.p₂d₁* představují různé varianty téhož složení, je možné hodnoty E_{int} zprůměrovat. Totéž lze učinit i v případě modelů *a.p₁d₂* a *b.p₁d₂*. Průměrné interakční energie tedy jsou -57 kcal/mol (*p₂d₁*) a -74 kcal/mol (*p₁d₂*). Velice silné interakce mezi molekulami doxorubicinu a kopolymerním řetězcem je možno z Obrázku 13c vysvětlit vnořením molekul doxorubicinu do „klubka“ zkrouceného polymerního řetězce. V ostatních modelech zůstaly molekuly doxorubicinu na povrchu, čemuž odpovídají i slabší interakční energie.

Na Obrázku 13 je také vidět, že segmenty PGA a PTMC často leží na sobě nebo se proplétají. Nejlépe je to možno pozorovat na Obrázcích 13e a 13f. Toto souhlasí s dobrou mísitelností PEG a PTMC, jak ukázaly výpočty E_{mix} (viz kapitola 3.1. *Určení nejvýhodnější polohy doxorubicinu na řetězci PTMC-PGA*).

Dále byly u všech modelů vypočítány hodnoty R_g stejným způsobem jako v kapitole 3.2. *Množství doxorubicinu na řetězci PTMC-PGA a jeho vliv na strukturu*. Z modelů byly nejdříve odstraněny molekuly doxorubicinu a poté se hodnota R_g počítala u modelů, které měly jenom jeden kopolymer. Pro modely obsahující kopolymery dva se hodnota R_g počítala nejprve u prvního kopolymeru a poté u kopolymeru druhého, dále také pro oba kopolymery dohromady. Výsledky jsou zapsány v Tabulce 5.

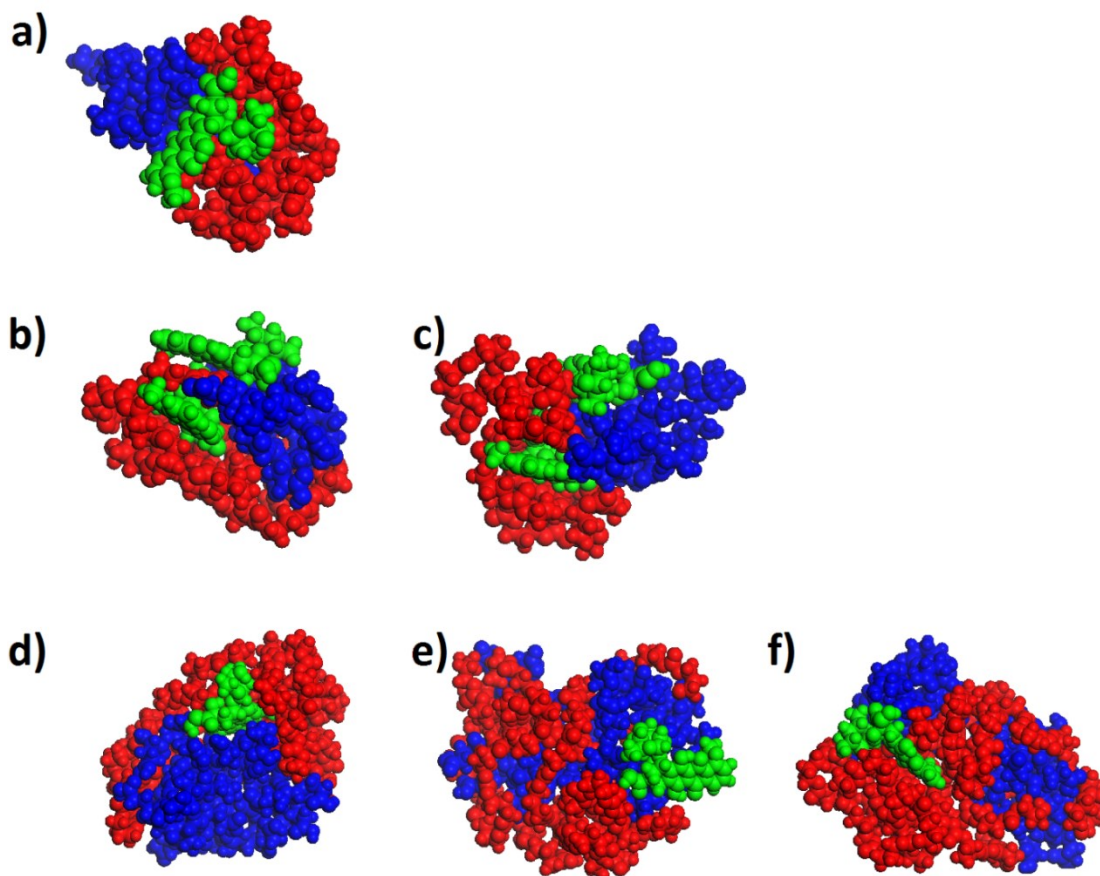
Kvantifikace zkroucení řetězce byla doplněna o porovnání s hodnotami R_g řetězců v modelech shodných s iniciálními modely uvedenými na začátku této kapitoly, avšak optimalizovaných bez doxorubicinu. Označení těchto modelů je shodné s původním označením, ale dolní index u písmena d je 0 (tedy bez doxorubicinu). Modely byly optimalizovány a byla spuštěna molekulární dynamika za stejných podmínek, jako u výše zmíněné šestice modelů studovaných v této kapitole výše. Hodnoty R_g byly vypočteny stejným způsobem a výsledky jsou rovněž uvedeny v Tabulce 5.

Tabulka 5: Hodnoty gyračního poloměru kopolymerních řetězců. U modelů obsahujících dva řetězce jsou uvedeny hodnoty gyračního poloměru pro každý řetězec zvlášť. Levá strana tabulky obsahuje gyrační poloměry vypočítané z modelů optimalizovaných s doxorubiciny, pravá strana tabulky obsahuje gyrační poloměry vypočítané z modelů optimalizovaných bez doxorubicinů.

| MODEL | R_g 1. kopolymeru (Å) | R_g 2. kopolymeru (Å) | MODEL | R_g 1. kopolymeru (Å) | R_g 2. kopolymeru (Å) |
|-------------------------------------|-------------------------------|-------------------------------|-------------------------------------|-------------------------------|-------------------------------|
| p₁d₁ | 9,94 ± 1,07 | — | p₁d₀ | 9,61 ± 0,17 | — |
| a.p₂d₁ | 10,58 ± 0,14 | 10,26 ± 0,32 | a.p₂d₀ | 9,43 ± 0,15 | 10,47 ± 0,09 |
| b.p₂d₁ | 12,61 ± 0,31 | 11,19 ± 0,20 | b.p₂d₀ | 10,64 ± 0,50 | 10,77 ± 0,10 |

| | | | | | |
|-------------------------------------|--------------|-------------|-------------------------------------|--------------|-------------|
| c.p₂d₁ | 9,67 ± 0,24 | 9,87 ± 0,12 | c.p₂d₀ | 12,08 ± 0,16 | 9,26 ± 0,15 |
| a.p₁d₂ | 9,82 ± 0,44 | – | a.p₁d₀ | 11,48 ± 0,12 | – |
| b.p₁d₂ | 10,43 ± 0,64 | – | b.p₁d₀ | 9,59 ± 0,10 | – |

Porovnání hodnot R_g pro kopolymerní řetězce z modelů optimalizovaných s a bez molekul doxorubicinu ukazuje, že přítomnost molekul doxorubicinu skutečně nedovoluje zkroucení řetězců, jak bylo konstatováno již u vizuálního pozorování modelů na Obrázcích 8, 9 a 10. Ve většině případů (sedm z devíti hodnot, viz Tabulka 5) mají řetězce v modelech optimalizovaných bez doxorubicinu nižší hodnotu R_g než řetězce v modelech optimalizovaných s doxorubicinem.



Obrázek 13: Již zkroucené optimalizované modely, ze kterých byly počítány hodnoty R_g . Modely jsou seřazeny následujícím způsobem a) p_1d_1 , b) $a.p_1d_2$, c) $b.p_1d_2$, d) $a.p_2d_1$, e) $b.p_2d_1$ a f) $c.p_2d_1$.

3.4. Modely podle experimentálních dat ve vodném prostředí

3.4.1. První modelovací strategie

Reálné vzorky v práci Sansona a kol. [22] byly připraveny a studovány ve vodném prostředí. V této kapitole tedy byly do modelů p_1d_1 , $a.p_1d_2$, $b.p_1d_2$, $a.p_2d_1$, $b.p_2d_1$ a $c.p_2d_1$ přidána voda. Hlavním cílem bylo srovnání hodnot E_{int} a R_g vypočtených z takto nově připravených modelů s hodnotami vypočtenými z modelů z předchozí kapitoly.

Pro přípravu modelů s vodou tedy byly použity iniciální modely z předchozí kapitoly a do periodické cely o rozměrech $150 \times 150 \times 150$ nm byly vkládány molekuly vody tak, aby ve výsledném modelu představovaly 75 % celkové hmotnosti. Do modelu p_1d_1 obsahujícího jeden řetězec ($C_{179}H_{265}N_{17}O_{121}$, $M = 4591,09$ g/mol) a jednu molekulu doxorubicinu ($C_{27}H_{27}NO_{11}$, $M = 541,51$ g/mol) bylo nutno vložit osm set padesát pět molekul vody. Do modelů $a.p_2d_1$, $b.p_2d_1$, $c.p_2d_1$ se dvěma kopolymery ($M = 9182,18$ g/mol) a jednou molekulou doxorubicinu tedy bylo přidáno tisíc šest set dvacet molekul vody. Devět set čtyřicet pět molekul vody bylo přidáno do modelů $a.p_2d_1$ a $b.p_2d_1$ obsahujících jeden kopolymer a dvě molekuly doxorubicinu ($M = 1083,02$ g/mol). Takto připraveným modelům zůstalo jejich původní označení, tzn. p_1d_1 , $a.p_1d_2$, $b.p_1d_2$, $a.p_2d_1$, $b.p_2d_1$ a $c.p_2d_1$.

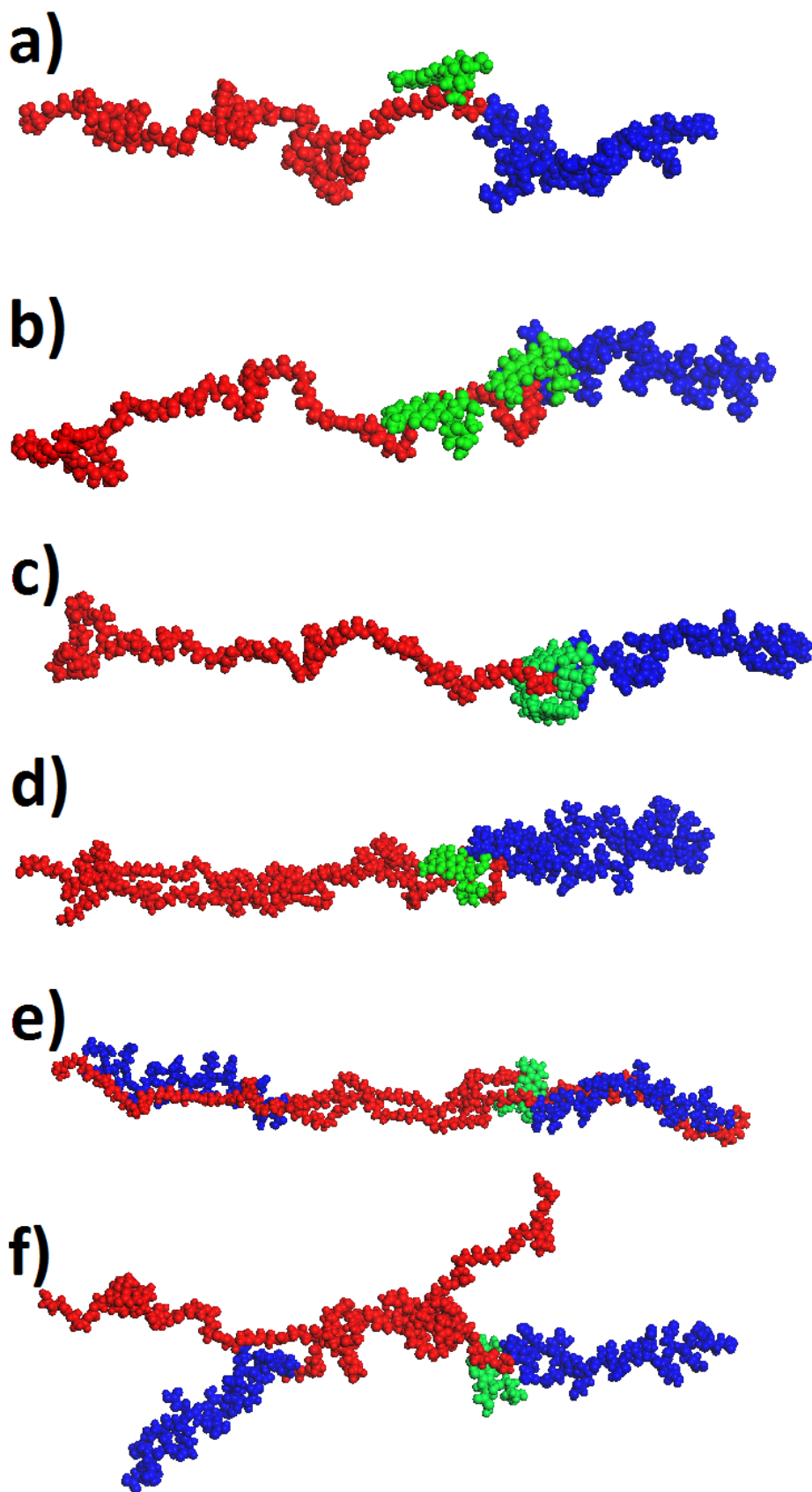
Řetězce a molekuly doxorubicinu byly od počátku rozptýleny ve vodě (tzn. jejich pozice v periodické cele i přes přidavek molekul vody zůstala stejná jako v původních modelech) a pomocí výpočtů bylo zjišťováno, zda vznikne shluk podobný optimalizovaným strukturám bezvodých modelů, nebo zda molekuly vody řetězce a molekuly doxorubicinu udrží od sebe. Šestice modelů obsahujících vodu byla optimalizována za stejných podmínek jako v kapitole 2., následně byla spuštěna molekulární dynamika. Z framů dynamické trajektorie byly vypočítány hodnoty E_{int} stejným způsobem jako v kapitole 2., avšak nejprve byla z modelů odstraněna voda. Hodnoty E_{int} byly počítány zvlášť pro první doxorubicin a zvlášť pro doxorubicin druhý. Výsledky jsou uvedeny v Tabulce 6.

Tabulka 6: Interakční energie prvního a druhého doxorubicinu v optimalizovaných modelech obsahujících molekuly vody a připravených 1. způsobem.

| MODEL | E_{int} 1. dox (kcal/mol) | E_{int} 2. dox (kcal/mol) |
|------------------------------|---|---|
| p_1d_1 | $-48,73 \pm 3,60$ | – |
| $a.p_2d_1$ | $-32,23 \pm 3,26$ | – |
| $b.p_2d_1$ | $-45,21 \pm 7,32$ | – |
| $c.p_2d_1$ | $-19,84 \pm 3,34$ | – |
| $a.p_1d_2$ | $-37,02 \pm 5,33$ | $-36,21 \pm 6,05$ |
| $b.p_1d_2$ | $-20,53 \pm 3,05$ | $-17,12 \pm 4,61$ |

Až na dvě výjimky (modely p_1d_1 a $b.p_2d_1$) se ukázalo, že v porovnání s modely neobsahujícími vodu (viz Tabulka 4) jsou hodnoty E_{int} vyšší, tzn. interakce mezi kopolymerními řetězci a molekulami doxorubicinu je slabší. Obrázek 14 ukazuje, že přítomnost vody brání v případě takto postavených modelů sbalení řetězců a doxorubicinů do kompaktního klastru. V případě modelu p_1d_1 je rozdíl oproti bezvodému modelu minimální. V případě modelu $b.p_2d_1$ je pokles hodnoty E_{int} (a tedy zesílení interakce) způsoben tím, že se molekula doxorubicinu dostala mezi řetězce, konkrétně mezi segment PTMC a přechod mezi PTMC a PGA. V tomto případě tedy ani přítomné molekuly vody nedokázaly tuto interakci oslabit.

Stejně jako v předchozím případě, i zde trojice modelů $a.p_2d_1$, $b.p_2d_1$ a $c.p_2d_1$ a dvojice modelů $a.p_1d_2$ a $b.p_1d_2$ představují různé varianty téhož složení. Průměrné hodnoty E_{int} tedy jsou přibližně -32 kcal/mol (p_2d_1) a -28 kcal/mol (p_1d_2).



Obrázek 14: Optimalizované modely, do nichž byly přidány molekuly vody, ze kterých se následně počítaly hodnoty R_g . Modely jsou seřazeny následujícím způsobem a) p_1d_1 , b) $a.p_1d_2$, c) $b.p_1d_2$, d) $a.p_2d_1$, e) $b.p_2d_1$ a f) $c.p_2d_1$.

Kromě vizuálního pozorování (Obrázek 14) bylo i u těchto modelů kvantifikováno zkroucení řetězců pomocí hodnot R_g , které byly vypočítány stejným způsobem jako v kapitole 3.2. *Množství doxorubicinu na řetězci PTMC-PGA a jeho vliv na strukturu.* Hodnoty R_g byly počítány z optimalizovaných modelů vždy bez molekuly doxorubicinu a bez molekul vody, a to tak, že u modelů s jedním kopolymerem se výpočet R_g spustil bez dalších úprav, ale u modelů se dvěma kopolymery se hodnota R_g počítala pro každý kopolymerní řetězec zvlášť. Výsledky jsou zapsány v Tabulce 7.

Tabulka 7: Hodnoty gyračního poloměru kopolymerních řetězců v modelech obsahujících vodu a připravených 1. způsobem. U modelů obsahujících dva řetězce, jsou uvedeny hodnoty gyračního poloměru pro každý řetězec zvlášť.

| MODEL | R_g 1. kopolymeru (Å) | R_g 2. kopolymeru (Å) |
|-------------------------------------|---|---|
| p₁d₁ | 28,35 ± 0,03 | – |
| a.p₂d₁ | 41,65 ± 0,05 | 42,26 ± 0,14 |
| b.p₂d₁ | 47,81 ± 0,02 | 47,09 ± 0,03 |
| c.p₂d₁ | 41,14 ± 0,09 | 27,69 ± 0,01 |
| a.p₁d₂ | 39,09 ± 0,07 | – |
| b.p₁d₂ | 42,21 ± 0,05 | – |

Je vidět, že hodnoty R_g jsou násobně vyšší, než v Tabulce 5. Modely obsahující vodu, avšak připravené z iniciálních modelů s náhodně rozmístěnými molekulami doxorubicinu a rovnými kopolymerními řetězci nevedou k reálnému výsledku, tzn. ke kompaktním shlukům, popisovaným v článku Sansona a kol. [22]. Z tohoto důvodu byla zvolena jiná strategie přípravy modelů obsahujících vodu.

3.4.2. Druhá modelovací strategie

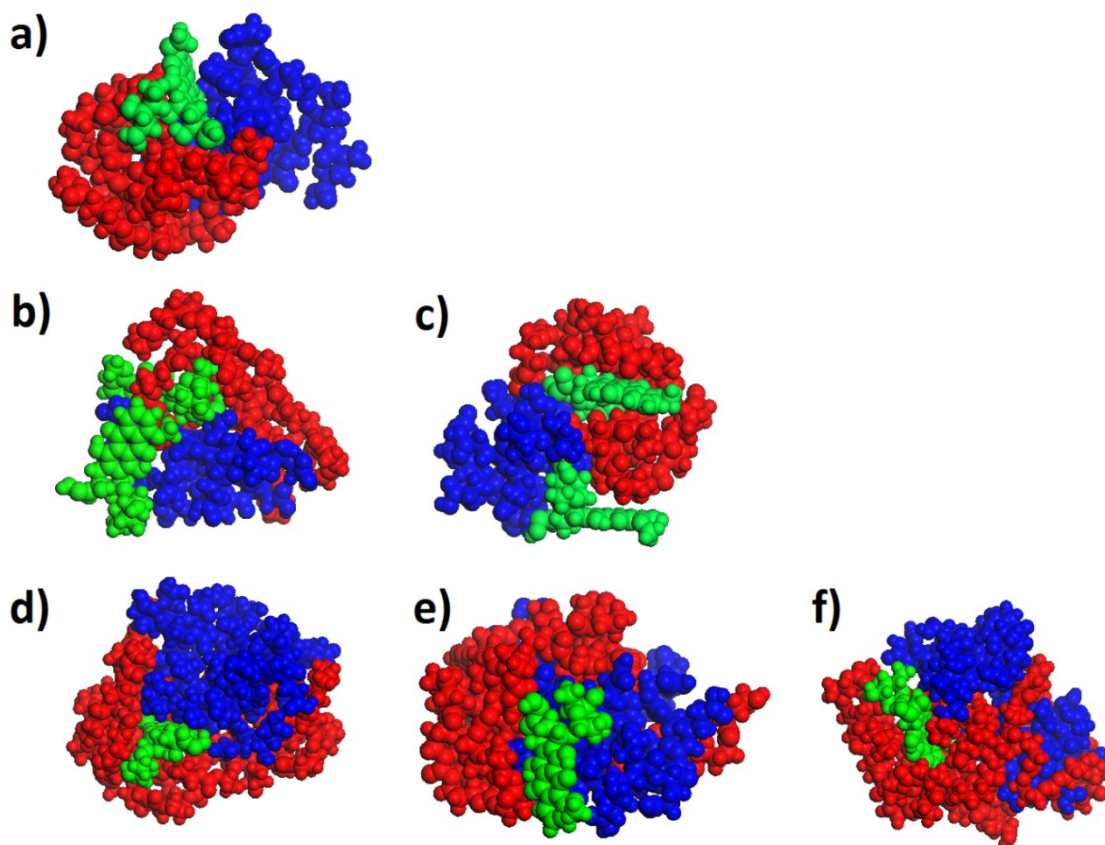
Použití iniciálních modelů (popsaných v kapitole 3.3. *Modely podle experimentálních dat*) k přípravě modelů obsahujících vodu nepřineslo očekávané výsledky. Takto připravené modely nevedou k tvorbě shluků popsaných v článku Sansona a kol. [22]. Proto byla v této části práce zvolena jiná strategie. Jako výchozí modely zde byly použity optimalizované modely z posledních framů trajektorie molekulární dynamiky z kapitoly 3.3. *Modely podle experimentálních dat*. Tyto modely již vytvořily shluky a molekuly vody byly přidávány okolo nich. Množství molekul vody zůstalo pro jednotlivé modely stejné jako v předchozí kapitole, neboť jde o totožné modely obsahující stejné množství řetězců a doxorubicinů, pouze jinak prostorově uspořádané. Otázkou tedy již nebylo, zda kopolymerní řetězce a molekuly doxorubicinu v přítomnosti vody vytvoří shluk, ale zda se již existující shluk v přítomnosti vody rozpadne či nikoliv. Kromě výpočtu parametrů E_{int} a R_g bylo také zjišťováno, zda v průběhu dynamiky voda naruší klastr a kolik molekul vody se dostane dovnitř klastru. Původní velikost periodické cely $150 \times 150 \times 150$ nm (viz kapitola 3.3. *Modely podle experimentálních dat*) se ukázala být nevhodná, jelikož měla vzhledem k již vytvořeným kompaktním shlukům příliš velké rozměry a výpočet tak trval hodně dlouho, neboť relaxační fázi předcházela zbytečně dlouhá fáze výpočtu, během které se prakticky nedělo nic jiného, než že se cela zmenšovala. Pro modely s vodou v této části práce byly tedy připraveny cely „tak akorát“, aby se do nich vešly všechny molekuly vody, řetězce a molekuly doxorubicinu, avšak bez zbytečného prázdného místa. Takto připraveným modelům zůstalo jejich původní označení, tzn. p_1d_1 , $a.p_1d_2$, $b.p_1d_2$, $a.p_2d_1$, $b.p_2d_1$ a $c.p_2d_1$. Velikost cely modelů byla zmenšena na $90 \times 90 \times 90$ nm a v případě modelu $b.p_2d_1$ na $80 \times 80 \times 80$ nm.

Modely byly optimalizovány za stejných podmínek jako v kapitole 3.2. *Množství doxorubicinu na řetězci PTMC-PGA a jeho vliv na strukturu*, následně byla spuštěna molekulární dynamika. Z framů dynamické trajektorie byly vypočítány hodnoty E_{int} stejným způsobem jako v kapitole 3.2. *Množství doxorubicinu na řetězci PTMC-PGA a jeho vliv na strukturu* a byly počítány zvlášť pro první doxorubicin a zvlášť pro doxorubicin druhý. Výsledky jsou zaznamenány v Tabulce 8.

Tabulka 8: Interakční energie prvního a druhého doxorubicinu v optimalizovaných modelech obsahujících vodu a připravených 2. způsobem.

| MODEL | E_{int} 1. dox (kcal/mol) | E_{int} 2. dox (kcal/mol) |
|------------------------------|--|--|
| p_1d_1 | $-62,36 \pm 2,83$ | — |
| a.p_2d_1 | $-45,73 \pm 11,89$ | — |
| b.p_2d_1 | $-40,09 \pm 3,54$ | — |
| c.p_2d_1 | $-76,74 \pm 4,99$ | — |
| a.p_1d_2 | $-44,89 \pm 10,95$ | $-46,91 \pm 10,13$ |
| b.p_1d_2 | $-76,46 \pm 3,36$ | $-78,35 \pm 5,51$ |

Průměrné hodnoty E_{int} pro trojici modelů $a.p_2d_1$, $b.p_2d_1$ a $c.p_2d_1$ a dvojici modelů $a.p_1d_2$ a $b.p_1d_2$ jsou přibližně -54 kcal/mol (p_2d_1) a -62 kcal/mol (p_1d_2). Srovnáním těchto průměrných hodnot a průměrných hodnot E_{int} z Tabulky 4 je možné udělat závěr, že přítomnost vody oslabuje interakci mezi doxorubicinem a kopolymerními řetězci. Jsou zde však rozdíly, protože zatímco v případě modelu p_2d_1 je oslabení interakce jen slabé (-54 kcal/mol ve vodě oproti -57 kcal/mol v bezvodém stavu), v případě modelu p_1d_2 interakce zeslábla mnohem více (-62 kcal/mol ve vodě oproti -74 kcal/mol v bezvodém stavu). Je zřejmé, že nadbytek kopolymeru vede k udržení síly interakce i v přítomnosti vody, zatímco při jeho menším množství voda vzájemnou interakci oslabuje. Problém modelu p_1d_1 , kdy v přítomnosti vody síla interakce vzrostla (-62 kcal/mol ve vodě oproti -45 kcal/mol v bezvodém stavu) ukazuje na nutnost většího množství iniciálních modelů, z nichž by byl vytvořen průměr. V tomto konkrétním případě lze zesílení E_{int} vysvětlit natočením molekuly doxorubicinu do energeticky výhodnější polohy a přiblížení funkčních skupin, což vedlo k silnější interakci i přes přítomnost okolní vody. Lokálně může k podobným situacím v reálném vzorku jistě docházet, ale v průměrném případě by (i vzhledem k výsledkům získaným z ostatních modelů) bylo logické očekávat, že přítomnost vody interakci oslabí. Optimalizované modely jsou ukázány na Obrázku 15.



Obrázek 15: Optimalizované modely z posledních framů trajektorie molekulární dynamiky z kapitoly 3., do nichž byly přidány molekuly vody, ze kterých se následně počítaly hodnoty Rg. Modely jsou seřazeny následujícím způsobem a) p_1d_1 , b) $a.p_1d_2$, c) $b.p_1d_2$, d) $a.p_2d_1$, e) $b.p_2d_1$ a f) $c.p_2d_1$.

Dále byly vypočítány hodnoty Rg stejným způsobem jako v kapitole 3.2. *Množství doxorubicinu na řetězci PTMC-PGA a jeho vliv na strukturu.* Hodnoty parametru Rg byly zjišťovány vždy bez molekul vody a bez molekuly doxorubicinu. U modelů s jedním kopolymérem se hodnoty Rg počítaly bez dalších úprav, ale u modelů se dvěma kopolyméry byly hodnoty Rg vypočítány pro každý řetězec zvlášť. Výsledky jsou zapsány v Tabulce 9. Porovnání hodnot Rg pro kopolymerní řetězce z modelů optimalizovaných s a bez molekul doxorubicinu opět ukazuje, že přítomnost molekul doxorubicinu nedovoluje zkroucení řetězců. Hodnoty Rg modelů p_1d_1 a p_1d_0 jsou téměř shodné, pouze v případě modelů $c.p_2d_1$, $c.p_2d_0$, $a.p_1d_2$, a $a.p_1d_0$ (viz Tabulka 9) mají řetězce v modelech optimalizovaných bez doxorubicinu nižší hodnotu Rg než řetězce v modelech optimalizovaných s doxorubicinem.

Tabulka 9: Hodnoty gyračního poloměru kopolymerních řetězců. U modelů obsahujících dva řetězce jsou uvedeny hodnoty gyračního poloměru pro každý řetězec zvlášť. Levá strana tabulky obsahuje gyrační poloměry vypočítané z modelů optimalizovaných s doxorubicin a vodou, pravá strana tabulky obsahuje gyrační poloměry vypočítané z modelů optimalizovaných s vodou, ale bez doxorubicinů.

| MODEL | Rg 1. kopolymeru (Å) | Rg 2. kopolymeru (Å) | MODEL | Rg 1. kopolymeru (Å) | Rg 2. kopolymeru (Å) |
|-------------------------------------|--|--|-------------------------------------|--|--|
| p₁d₁ | 9,75 ± 0,09 | – | p₁d₀ | 9,88 ± 0,04 | – |
| a.p₂d₁ | 10,99 ± 0,09 | 10,71 ± 0,07 | a.p₂d₀ | 9,16 ± 0,09 | 9,67 ± 0,07 |
| b.p₂d₁ | 13,10 ± 0,14 | 11,47 ± 0,11 | b.p₂d₀ | 9,49 ± 0,10 | 11,40 ± 0,06 |
| c.p₂d₁ | 9,57 ± 0,06 | 10,11 ± 0,05 | c.p₂d₀ | 10,60 ± 0,05 | 9,24 ± 0,06 |
| a.p₁d₂ | 10,14 ± 0,09 | – | a.p₁d₀ | 12,67 ± 0,11 | – |
| b.p₁d₂ | 10,19 ± 0,10 | – | b.p₁d₀ | 9,43 ± 0,14 | – |

3.5. Pronikání vody a struktura reálných částic

Pro zjištění množství proniklých molekul vody do klastru bylo použito metody publikované v [23], tedy všechny molekuly vody, jejichž poloha se nachází středu klastru blíže, než je jeho hodnota Rg byly považovány za proniklé, ostatní nikoliv. Hodnoty Rg klastru jako celku a množství proniklé vody (N) jsou srovnány v Tabulce 10. Závislost množství proniklé vody na složení vzorku i na hodnotách Rg je více zřejmá z průměrných hodnot, které jsou uvedeny ve sloupcích vlevo. Jak již bylo ukázáno dříve (viz kapitola 3.1. *Určení nejvýhodnější polohy doxorubicinu na řetězci PTMC-PGA*), větší množství molekul doxorubicinu omezuje zkroucení kopolymerních řetězců, takže hodnota Rg je největší pro model p_1d_2 . S rostoucí hodnotou Rg roste i počet molekul proniklé vody. Bližší analýza rozložení molekul vody neukázala žádnou výraznou

pravidelnost v jejich přítomnosti na určitých místech. Pravděpodobně by bylo zapotřebí nechat modely, aby se v molekulární dynamice vyvíjely delší dobu.

Tabulka 10: Hodnota R_g klastru jako celku, množství (N) proniklé vody v procentech, což je podíl počtu molekul vody uvnitř klastru a celkového počtu molekul vody v modelu.

| MODEL | R_g (Å) | N (%) | $R_{g \text{ prum}}$ (Å) | N_{prum} (%) |
|-------------------------------------|-----------|-------|-----------------------------|--------------------------|
| p₁d₁ | 9,72 | 0,93 | 9,72 | 0,93 |
| a.p₂d₁ | 10,35 | 4,63 | 10,89 | 3,48 |
| b.p₂d₁ | 10,03 | 3,52 | | |
| c.p₂d₁ | 12,3 | 2,28 | | |
| a.p₁d₂ | 12,88 | 6,03 | 12,5 | 3,71 |
| b.p₁d₂ | 12,12 | 1,38 | | |

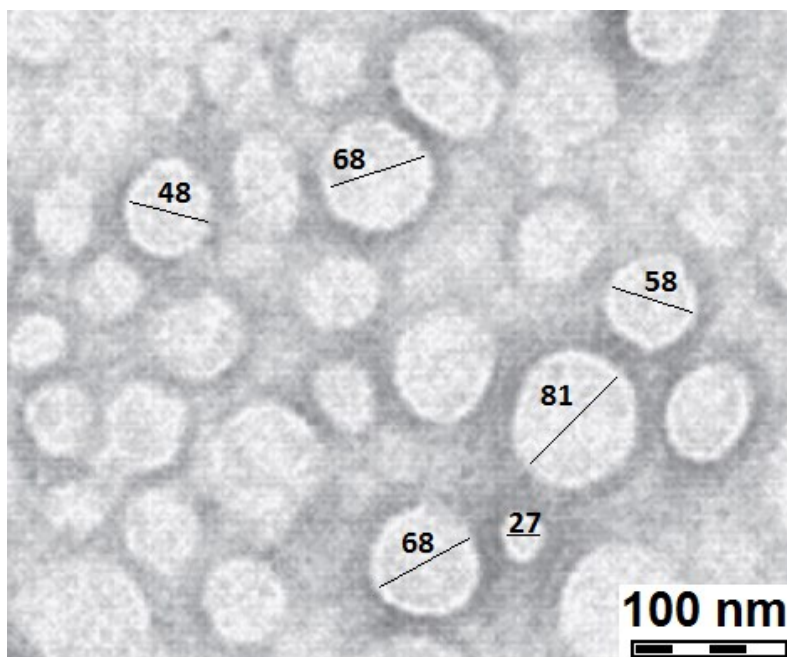
Modely *a.p₁d₂* a *b.p₁d₂* představují nejmenší možný klustr s $DLC = 23$ hm.%. Jejich průměrná hodnota R_g proto může posloužit k odhadu počtu doxorubicinů v jednom shluku podle fotografie z TEMu (Figure 4a) v článku Sansona a kol. [22]. Fotografie je na Obrázku 16. Zároveň je možné určit, jak veliký by musel být model napodobující klustr reálné velikosti. Byl proto změřen průměr několika klastrů z Obrázku 16, byly vypočteny jejich objemy a tyto pak byly ještě zprůměrovány. Zároveň byla k výpočtu objemu klastrů v modelech *p₁d₂* použita hodnota R_g a i v tomto případě se pak spočetl průměr. Hodnoty jsou uvedeny v Tabulce 11.

Při porovnání průměrné hodnoty objemu reálného a modelového klastru je patrné, že skutečný objem je více než dvanáct a půl tisíckrát větší, než objem modelového klastru. Na základě údajů získaných měření průměrů částic na snímku na Obrázku 16 lze tedy vydedukovat, že se v reálném vzorku průměrného klastru s hodnotou $DLC = 23$ hm.%, se nachází přibližně 25 000 molekul doxorubicinu a v přepočtu na hmotnost tedy

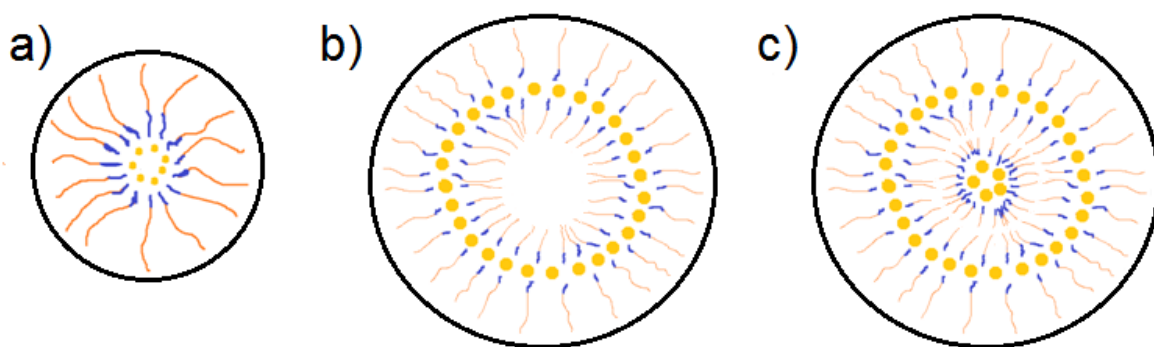
průměrný klastř obsahuje $2,25 \cdot 10^{-17}$ g doxorubicinu. Velikosti klastřů na Obrázku 16 a znalost délky řetězce PTMC-PGA (13,3 nm) dále umožňuje odhad vnitřní struktury reálných klastřů. Průměr nejmenšího z nich (27 nm) přibližně odpovídá dvojnásobku délky řetězce PTMC-PGA. Pokud vynecháme představu náhodného shluku zkroucených řetězců, tedy že by částice na Obrázku 16 byly amorfni shluk řetězců PTMC-PGA a molekul doxorubicinu, musí být větší klastry zřejmě uspořádány jinak. V úvahu přichází dvojvrstvá micela nebo trojvrstvá micela. V takovém případě by struktura pravděpodobně vypadala tak, jako na Obrázku 17, pouze ale za předpokladu, že částice jsou homogenní a nejsou složeny z menších částic. Jelikož je fotografie málo ostrá, nelze určit, zda je každý kulový útvar na fotografii jedna samostatná částice.

Tabulka 11: Průměr klastřů (d) a jejich objem (V) pro reálný vzorek i pro modely p_1d_2 . Průměrné hodnoty d a V jsou v řádcích „průměr“.

| KLASTR | d (nm) | V (nm³) |
|-------------------------------------|---------------|---------------------------|
| a | 58 | 2642 |
| b | 68 | 3604 |
| c | 68 | 3600 |
| d | 48 | 1786 |
| e | 81 | 5109 |
| f | 27 | 564 |
| <i>průměr</i> | 58 | 2651 |
| model | d (nm) | V (nm³) |
| a.p₁d₂ | 2,576 | 8,95 |
| b.p₁d₂ | 2,424 | 7,46 |
| <i>průměr</i> | 2,5 | 8,18 |



Obrázek 16: Fotografie shluků kopolymeru PTMC-PGA s doxorubicinem v prostředí s neutrálním pH, pořízená transmisním elektronovým mikroskopem. Hodnota DLC (odpovídající hodnotám w_2) u tohoto vzorku je 23 hm.%. Převzato a upraveno podle Figure 4 v [22].



Obrázek 17: Ukázka možných struktur micel a) jednovrstvých, b) dvouvrstvých a c) třívrstvých, odhadovaných na základě znalosti délky řetězce PTMC-PGA. Poměry velikostí micel nejsou pro přehlednost ve správném měřítku.

4. Závěr

V prvním kroku bakalářské práce byla vypracována literární rešerše na témata doxorubicin, obecný přehled dělení, přípravy a vlastností polymerů, biodegradabilní polymery PGA a PTMC a metody molekulárního modelování. Rovněž jsem se seznámila se základy práce v modelovacím prostředí Materials Studio.

Praktická část bakalářské práce byla věnována molekulárnímu modelování biodegradabilního kopolymeru PTMC-PGA a léčivu doxorubicinu. Na základě dat z odborné literatury byly postaveny iniciální modely kopolymerního řetězce, molekuly doxorubicinu a modely obsahující různý počet a různou vzájemnou prostorovou orientaci obou složek v prostředí s vodou i bez vody.

Výpočty interakční energie mezi léčivem a řetězcem umožnily určit, že k navázání léčiva dochází na segmentu PGA. Také byly provedeny kontrolní výpočty mísitelnosti jednotlivých složek modelů, které potvrdily předešlé výsledky. Bylo stanoveno potenciálně nejvyšší množství molekul doxorubicinu na kopolymerním řetězci PGA-PTMC a byl sledován vliv různého množství doxorubicinu na strukturu kopolymerního řetězce. K přesnému popisu jeho zkroucení byl použit výpočet gyračního poloměru.

Na základě údajů z literatury byly postaveny modely nejmenších možných částic obsahujících stejný hmotnostní poměr kopolymeru a doxorubicinu jako v experimentu a studovala jsem jejich chování ve vodném prostředí. Pro porovnání byly studovány také modely neobsahující vodu a modely bez molekul doxorubicinu. Pro stavbu iniciálních modelů v této části práce byly použity dvě rozdílné modelovací strategie a porovnáním jejich výsledků zjištěna ta správná, která vede k realistickým modelům.

Vzhledem k tomu, že modelované klastry představovaly nejmenší možný podíl hmotností doxorubicinu a kopolymeru v reálných vzorcích, byl v závěru této práce použit model k odhadu počtu molekul v reálném vzorku a ke stanovení jeho pravděpodobné struktury.

Reference

- [1] *Co je to nanotechnologie?* [online]. In.: [cit. 2015-05-12]. Dostupné z: <http://www.nano-concept.cz/co-je-to-nanotechnologie/>.
- [2] ŠRÁMEK, J. *Nanotechnologie v medicíně* [online]. In.: Brno, 2009 [cit. 2015-05-12]. Dostupné z: <http://www.med.muni.cz/biofyz/doc/NMgr/nanotech.pdf>.
- [3] *Doxorubicin* [online]. 2012 [cit. 2015-05-5]. Dostupné z: <http://chemocare.com/chemotherapy/drug-info/doxorubicin.aspx#.VJ61ZF4AA>.
- [4] *Doxorubicin* [online]. 2015 [cit. 2015-05-5]. Dostupné z: <http://www.linkos.cz/farmakoterapie/databaze-onkologickych-leciv/lecivo/id/25/>.
- [5] KYNCLOVÁ, J. *Studium interkalace a kovalentní vazby doxorubicinu do deoxyribonukleové kyseliny za využití voltametrie a impedanční spektroskopie* [online]. Brno, 2010 [cit. 2015-05-10]. Dostupné z: http://www.vutbr.cz/www_base/zav_prace_soubor_verejne.php?file_id=29513. bakalářská práce.
- [6] DUCHÁČEK, V.: *Polymery - výroba, vlastnosti, zpracování, použití*. 2. vyd. Vysoká škola chemicko-technologická v Praze [online]. Praha 2006. ISBN 80-7080-617-6, [cit. 2015-05-10]. Dostupné z: http://vydavatelstvi.vscht.cz/knihy/uid_isbn-80-7080-617-6/pages-img/015.html.
- [7] ŠVORČÍK, V. *Polymery „stručně“* [online]. In.: [cit. 2015-05-16]. Dostupné z: <http://old.vscht.cz//ipl/osobni/svorcik/Polymery.pdf>.
- [8] NILSSON, K. *Synthesis and assembly of biodegradable/ compatible graft copolymers for biomedical applications* [online]. 2011, : 48 [cit. 2015-05-11]. Dostupné z: <http://www.diva-portal.org/smash/get/diva2:528918/FULLTEXT01.pdf>.
- [9] BAJAJ, I. a R. SINGHAL. *Poly (glutamic acid) – An emerging biopolymer of commercial interest* [online].: 5551–5561 [cit. 2015-05-11]. doi:10.1016/j.biortech.2011.02.047 Dostupné z: <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S096085241100232X>.
- [10] KIM, M. S., H. HYUNA, B. S. KIMA, G. KHANGB a H. B.LEEA. *Polymeric nano-micelles as drug carrier using polyethylene glycol and polytrimethylene carbonate linear and star-shaped block copolymer* [online]. (2008): 646–650 [cit. 2015-05-11].

doi:10.1016/j.cap.2007.04.042 Dostupné z: <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S1567173907001125>.

[11] KUBÍČKOVÁ, E. *Molekulové modelování – struktura a vlastnosti cyklických esterů* [online]. Brno, 2014 [cit. 2015-05-11]. Dostupné z: https://dspace.vutbr.cz/xmlui/bitstream/handle/11012/31485/bakal%C3%A1%C5%99sk%C3%A1%20pr%C3%A1ce_kub%C3%AD%C4%8Dkov%C3%A1.pdf?sequence=1&isAllowed=y. bakalářská práce.

[12] KUCHAR, J. *Výzkum a vývoj léčiv* [online]. 1. Praha: Vysoká škola chemicko-technologická v Praze, 2008. ISBN 978-80-7080-677-7 [cit. 2015-05-11]. Dostupné z: http://vydavatelstvi.vscht.cz/knihy/uid_isbn-978-80-7080-677-7/pages-img/114.html.

[13] SCHLEGEL, B. *Geometry optimization* [online]. In: . 2011 [cit. 2015-05-11]. Dostupné z: http://chem.wayne.edu/schlegel/Pub_folder/346.pdf.

[14] BERENDSEN, H.J.C., J.P.M. POSTMA, W.F. VAN GUNSTEREN, A. DINOLA a J.R. HAAK. *Molecular dynamics with coupling to an external bath. The Journal of Chemical Physics* 81 [online]. 1984, roč. 81, č. 8, s. 3684–3690 [cit. 2015-05-5]. DOI: 10.1063/1.448118. Dostupné z: <http://dx.doi.org/10.1063/1.448118>.

[15] NOSÉ, S. A molecular-dynamics method for simulations in the canonical ensemble. *Molecular Physics: An International Journal at the Interface Between Chemistry and Physics* [online]. 1984, roč. 52, č. 2, s. 255-268 [cit. 2015-05-5]. DOI: 10.1080/00268978400101201. Dostupné z: <http://www.tandfonline.com/doi/abs/10.1080/00268978400101201#>.

[16] *Materials studio*, [online]. [cit. 2015-05-5]. Dostupné z: [file:///C:/Program%20Files%20\(x86\)/Accelrys/Materials%20Studio%207.0/share/doc/MaterialsStudio.htm#core/binder/welcome.htm](file:///C:/Program%20Files%20(x86)/Accelrys/Materials%20Studio%207.0/share/doc/MaterialsStudio.htm#core/binder/welcome.htm).

[17] SUN, H. *COMPASS: An ab Initio Force-Field Optimized for Condensed-Phase Applications Overview with Details on Alkane and Benzene Compounds*. J. Phys. Chem. B [online]. 1998, roč. 102, č. 38, s. 7338–7364 [cit. 2015-05-04]. DOI: 10.1021/jp980939v. Dostupné z: <http://pubs.acs.org/doi/abs/10.1021/jp980939v>.

[18] FLORY, P. J. *Principles of Polymer Chemistry* [online]. 1953 [cit. 2015-05-05]. ISBN 0-8014-0134-8. Dostupné z: <https://books.google.cz/books?hl=cs&lr=&id=CQ0EbEkT5R0C&oi=fnd&pg=PR5&dq=Flory+PJ+1995+Principles+of+polymer+che>

mistry&ots=15uUdSEmgu&sig=SWvrPciiDFvI0v2LgYXJ1G9rFAo&redir_esc=y#v=onepage&q&f=false.

[19] BLANCO, M. *Molecular silverware. I. General solutions to excluded volume constrained problems*. Journal of Computational Chemistry [online]. 1991, roč. 12, č. 2, s. 237-247 [cit. 2015-05-05]. DOI: 10.1002/jcc.540120214. Dostupné z: <http://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1002/jcc.540120214/abstract>.

[20] RIGBY, D., H. SUN a B. E. EICHINGER. *Computer simulations of poly(ethylene oxide): force field, pvt diagram and cyclization behaviour*. Polymer International [online]. 1997, roč. 44, č. 3, s. 311-330 [cit. 2015-05-05]. DOI: 10.1002/(SICI)1097-0126(199711)44:3<311::AID-PI880>3.0.CO;2-H. Dostupné z: [http://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1002/\(SICI\)1097-0126\(199711\)44:3%3C311::AID-PI880%3E3.0.CO;2-H/abstract](http://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1002/(SICI)1097-0126(199711)44:3%3C311::AID-PI880%3E3.0.CO;2-H/abstract).

[21] POUCHLÝ, J. *Fyzikální chemie makromolekulárních a koloidních soustav*. 3. Praha: Vysoká škola chemicko-technologická v Praze, [online]. 2008. ISBN 978-80-7080-674-6. [cit. 2015-05-05]. Dostupné také z: <http://generator.citace.com/dok/XJQ3Q1fL v9kNrIOZ>.

[22] SANSON, CH., CH. SCHATZ, J.F.L. MEINS, A. SOUM, J. THÉVENOT, E. GARANGER, S. LECOMMANDOUX. *A simple method to achieve high doxorubicin loading in biodegradable polymersomes* [online]. 2010, : 428–435 [cit. 2015-05-10]. doi:10.1016/j.jconrel.2010.07.123 Dostupné z: <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0168365910006504>.

[23] TOKARSKÝ, J., T. ANDRÝSEK, P. ČAPKOVÁ, *Molecular modeling of gel nanoparticles with cyclosporine A for oral drug delivery*. International Journal of Pharmaceutics [online]. 410 (2011) 196–205 [cit. 2015-05-10]. doi:10.1016/j.ijpharm.2011.03.026 Dostupné z: <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0378517311002432>.